



FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA

PROGRAMA: PATOLOGÍA DE LOS TUMORES HUMANOS (CÓDIGO:285B)

**“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE TRANSICIÓN EPITELIO-  
MESENQUIMAL Y DE CÉLULA MADRE CANCEROSA EN EL MELANOMA  
CUTÁNEO, Y SU ASOCIACIÓN CON LA PROGRESIÓN TUMORAL”**

**Memoria para optar al grado de Doctora por la Universidad de Valencia**

Presentada por:

**LIRIA TERRÁDEZ MAS**

Dirigida por los doctores:

CARLOS MONTEAGUDO CASTRO

ROSARIO GIL BENSO

Valencia, 2015







El trabajo titulado:

**“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL Y DE CÉLULA MADRE CANCEROSA EN EL MELANOMA CUTÁNEO, Y SU ASOCIACIÓN CON LA PROGRESIÓN TUMORAL”,**

que se presenta en esta memoria, ha sido realizado por la licenciada en Medicina y Cirugía Dña. Liria Terrádez Mas bajo nuestra dirección.

Dicho trabajo reúne todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa como **TESIS DOCTORAL**.

Y para que así conste a los efectos oportunos, realizamos esta declaración en Valencia a 29 de septiembre de 2015.

Fdo: Carlos Monteagudo Castro  
Catedrático de Anatomía Patológica,  
Universitat de Valencia

Fdo: Rosario Gil Benso  
Catedrática de Biología y Genética,  
Universitat de Valencia



Este trabajo ha sido financiado gracias a las siguientes ayudas para la investigación:



Prometeo 2011/084

Programa Prometeo para Grupos de Investigación de Excelencia.  
Generalitat Valenciana, Consellería de Educación.

**Título: Estudio clínico y experimental de la influencia de los perfiles de expresión combinada de marcadores de célula madre cancerosa y de transición epitelio-mesenquimal en la progresión tumoral del melanoma cutáneo “in vivo”.**

Investigador principal: Carlos Monteagudo Castro.

Periodo 2011-2014.



Becas para proyectos de investigación en biomedicina.

Consellería de Sanidad-EVES. AP-032/10

**Título: “Determinación de parámetros clínico-patológicos y moleculares implicados en la regresión espontánea de las neoplasias melanocíticas cutáneas”**

Investigador principal: Carlos Monteagudo Castro



Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre.

*Marie Curie (1867-1934)*



***A mi yayete***





## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es el fruto de años de esfuerzo, y en su elaboración han colaborado de forma altruista varias personas, sin cuya contribución, no habría sido posible realizarlo.

Gracias en primer lugar a mis directores Carlos Monteagudo y Rosario Gil.

A Carlos. Gracias por la ayuda que me has brindado y los ánimos que me has dado, incluso en los momentos más duros. Hemos aprendido a reírnos de nosotros mismos en los días difíciles. No sólo tienes mi absoluta admiración, sino también mi sincera amistad.

A Rosario. Muchas gracias por tu colaboración. Aún en momentos duros para ti, siempre has tenido palabras de aliento para mí, y tus aportaciones, siempre constructivas, me han empujado a querer hacerlo todo mejor. Tú me animaste a convertirme en patóloga, y me inspiras para ser mujer investigadora. Te estaré siempre agradecida.

A Carmen Carda. Muchas gracias por ayudarme en la parte experimental. Sin ti, no habría sido posible.

A Ana Clari, por tu colaboración con los cultivos celulares y tu inagotable buen humor.

A Robert Callaghan y Sandra Pinto. Gracias por vuestra inestimable ayuda con la citometría de flujo.

A Teresa San Miguel, Beatriz Sánchez Sendra, y Lara Navarro. No sólo habéis hecho un esfuerzo ayudándome con la biología molecular y los problemas técnicos de Excel y Word...¡Subir a veros es como ver aparecer la luz del sol! ¡Le alegráis el día a cualquiera!...Muchas gracias.

A Dani Sanchis y a Laura Martínez, por vuestra ayuda en los aspectos técnicos del trabajo, por enseñarme a hacer matrices tisulares, y ayudarme con la inmunohistoquímica.

A David Ramos, por ayudarme con las matrices tisulares que conforman este trabajo.

A Iván Arribas, y sobre todo a Marisa. Gracias por vuestra ayuda en el análisis estadístico. No olvidaré las interminables tardes intentando comprender el mundo de la estadística. Marisa, gracias por estar a mi disposición y dedicarme horas incontables. A Juan, por compartir a Marisa conmigo, y hacernos más llevaderos esos momentos.

A mis compañeros de trabajo del Hospital de Manises. Núria, Mariaje, trabajar con vosotras fue un regalo.

A mis compañeros del Hospital Clínico y del departamento de Patología. Me siento muy afortunada por haber podido volver a mi “casa”. Sigo aprendiendo de vosotros cada día. Gracias Octavio por ponerle banda sonora a muchas tardes de trabajo. Gracias Eli, por hacer más fáciles los días.

A todos los residentes con los que he coincidido estos años. Me hacéis sentir una más. Gracias por servir de estímulo constante y aportar un ambiente alegre y divertido.

A Silvia Calabuig, por enseñarme a manipular a los animales de experimentación, nuestras “ratitas”, y ayudarme cada día, incluso en la distancia. Siempre estaré en deuda contigo.

A Núria. Por estar siempre a mi lado, en lo bueno y en lo malo, en el trabajo y en la vida. Siempre encuentras palabras de apoyo, consuelo y ánimo. Siempre estás dispuesta a ayudar. Tenerte como amiga es el mejor legado de mi residencia.

A mis amigos, con los que emprendí la aventura de convertirnos en médicos, y sigo compartiendo preocupaciones y risas. Y en especial a Ana, por entenderme y

escucharme, por tus consejos siempre sabios. No sé cuantas veces habremos pronunciado la palabra tesis...

A mi yayete, por insistir en la importancia de la realización de este trabajo e interesarte constantemente por su evolución. Gracias.

A mi familia y a los tatos, por ayudarme cuando habéis tenido la oportunidad.

A mis padres por animarme, cuidarme y facilitarme el trabajo. Gracias por estar siempre a mi lado.

A mis hijos, por el tiempo del que les he privado de estar con su mami. Habéis compartido este trabajo conmigo más de lo que creéis, incluso acompañándome desde dentro...

A Luis. No tengo palabras para agradecerte todo lo que haces por mi. Gracias por tu comprensión. Somos un equipo.

A todos los que os alegráis de que por fin esté terminada,

MUCHAS GRACIAS.



## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>29</b>
<b>1.INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA: .....</b>	<b>31</b>
<b>1.1. INCIDENCIA DEL MELANOMA CUTÁNEO .....</b>	<b>31</b>
<b>1.2.MORTALIDAD DEL MELANOMA CUTÁNEO: .....</b>	<b>32</b>
<b>1.3. FACTORES PRONÓSTICOS DEL MELANOMA PRIMARIO:.....</b>	<b>33</b>
1.3.1. MARCADORES PRONÓSTICOS TISULARES CONVENCIONALES .....	34
1.3.1.1. Índice de Breslow (IB) .....	34
1.3.1.2. Índice mitótico (IM).....	35
1.3.1.3. Ulceración .....	35
1.3.1.4. Linfocitos intratumorales .....	36
1.3.1.5.Nivel de Clark .....	37
1.3.1.6. Fase de crecimiento tumoral.....	37
1.3.1.7. Regresión.....	38
1.3.1.8. Invasión linfovascular.....	38
1.3.1.9. Satelitos .....	39
1.3.1.10. Tipo histológico .....	39
1.3.1.11. Metástasis ganglionar .....	39
1.3.2. BIOMARCADORES PRONÓSTICOS .....	40
1.3.3. FIRMAS GENÉTICAS .....	41
1.3.4. BRAF/NRAS .....	41
<b>1.4. TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL. ....</b>	<b>43</b>
1.4.1. DEFINICIÓN .....	43
1.4.2. REGULACIÓN DE LA EMT. FACTORES IMPLICADOS.....	44
1.4.3. EMT EN MELANOMA .....	47
1.4.4. EMT Y PROGRESIÓN TUMORAL.....	49
1.4.5. EMT Y CÉLULAS MADRE .....	49
1.4.6. EMT, CÉLULAS MADRE Y RESISTENCIA A DROGAS .....	50
<b>1.5. CÉLULAS MADRE .....</b>	<b>51</b>
1.5.1. INTRODUCCIÓN.....	51
1.5.2. CÉLULAS MADRE CANCEROSAS (CMC) .....	52
1.5.3. CÉLULAS MADRE DE MELANOMA (CMM).....	53
1.5.4. CONTROVERSIAS CON RESPECTO A LAS CMM.....	55
<b>1.6. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS .....</b>	<b>56</b>
1.6.1. HIPÓTESIS .....	56
1.6.2. OBJETIVOS .....	57
<i>Parte clínica:</i> .....	57
<i>Parte experimental:</i> .....	58
<b>2.METODOLOGÍA .....</b>	<b>59</b>
<b>2. METODOLOGÍA .....</b>	<b>61</b>
2.1. ESTUDIO CLÍNICO-PATOLÓGICO .....	61
<i>A-Pacientes .....</i>	<i>61</i>
<i>A-1. Selección de muestras.....</i>	<i>61</i>
<i>A-2. Variables estudiadas.....</i>	<i>63</i>

B.-Construcción de matrices tisulares (TMA) .....	64
C.-Protocolos empleados en la técnicas de inmunotinción .....	66
D-Evaluación de la inmunoreactividad:.....	70
E-Marcadores inmunohistoquímicos empleados .....	70
F.-Biología molecular: Estudio de expresión génica .....	74
2.2. PARTE EXPERIMENTAL .....	89
A.- CULTIVOS CELULARES: .....	89
B.- XENOTRANSPLANTES .....	92
C. CITOMETRÍA DE FLUJO .....	97
2.3. ESTUDIO ESTADÍSTICO .....	98
<b>3. RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL .....</b>	<b>103</b>
<b>3. RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL .....</b>	<b>105</b>
<b>I-ESTUDIO EN MELANOMAS HUMANOS .....</b>	<b>105</b>
<b>I.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA .....</b>	<b>105</b>
<b>I.2. FACTORES DE TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL Y PROGRESIÓN TUMORAL .....</b>	<b>106</b>
I.2.1. RELACIÓN CON LA FASE DE CRECIMIENTO TUMORAL: .....	106
I.2.1.1. Estudio inmunohistoquímico:.....	106
I.2.1.2. Estudio por RT-PCR:.....	109
I.2.2.RELACIÓN CON LA FASE EVOLUTIVA DEL ESPECTRO DE PROGRESIÓN TUMORAL (MELANOMA PRIMARIO DELGADO, MELANOMA PRIMARIO GRUESO, METÁSTASIS EN TRÁNSITO, METÁSTASIS GANGLIONAR, METÁSTASIS A DISTANCIA) .....	110
I.2.2.1. Estudio inmunohistoquímico:.....	110
I.2.2.1.1. Osteonectina/SPARC .....	110
I.2.2.1.2. Osteopontina.....	111
I.2.2.1.3. Cadherina-N .....	113
I.2.2.1.4. TWIST .....	114
I. ....	116
I. ....	116
I. ....	116
I. ....	117
I.2.3. EXPRESIÓN DE MARCADORES DE EMT EN RELACIÓN CON PARÁMETROS PRONÓSTICOS CLÁSICOS....	119
I.2.3.1. Índice de Breslow: .....	122
I.2.3.1.1 Estudio inmunohistoquímico:.....	122
I.2.3.1.2. Estudio por RT-PCR:.....	123
I.2.3.2. Ulceración .....	123
I.2.3.2.1 Estudio inmunohistoquímico:.....	123
I. ....	124
I. ....	124
<b>I.3. MARCADORES DE CÉLULA MADRE CANCEROSA Y PROGRESIÓN TUMORAL .....</b>	<b>126</b>
I.3.1. FASE DE CRECIMIENTO TUMORAL .....	126
I.3.1.1. Estudio inmunohistoquímico .....	126
I.3.1.2. Estudio por RT-PCR.....	126
I.3.2. RELACIÓN CON LA FASE EVOLUTIVA DEL ESPECTRO DE PROGRESIÓN TUMORAL: MELANOMA PRIMARIO DELGADO, MELANOMA PRIMARIO GRUESO, METÁSTASIS EN TRÁNSITO, METÁSTASIS GANGLIONAR, METÁSTASIS A DISTANCIA. ....	127
I.3.2.1. Estudio con técnicas inmunohistoquímicas.....	127

I.3.2.1.1. CD133:.....	127
I.3.2.1.2. ABCB5:.....	128
I.3.2.1.3. CD34.....	129
I.3.2.2. Estudio por PCR:.....	129
I.3.3. EXPRESIÓN DE MARCADORES DE CÉLULA MADRE TUMORAL EN RELACIÓN CON PARÁMETROS PRONÓSTICOS CLÁSICOS .....	130
I.3.3.1. Relación con el índice de Breslow.....	132
I.3.3.1.1 Estudio inmunohistoquímico .....	132
I.3.3.1.2 Estudio por RT-PCR.....	133
I.3.3.2. Relación con la ulceración:.....	133
I.3.3.2.1 Estudio inmunohistoquímico .....	133
I.3.3.2.2 Estudio por RT-PCR.....	134
I.3.3.3. Relación con el índice mitótico:.....	134
I.3.3.3.1 Estudio inmunohistoquímico .....	134
I.3.3.3.2 Estudio por RT-PCR.....	135
<b>I.4. PERFILES DE EXPRESIÓN DE MARCADORES DE EMT Y CÉLULA MADRE TUMORAL .....</b>	<b>136</b>
I.4.1. METÁSTASIS VERSUS MELANOMAS PRIMARIOS: .....	136
I.4.1.1. Resultados en estudio por PCR:.....	136
I.4.1.2. Resultados en el estudio inmunohistoquímico: .....	137
I.4.2. METÁSTASIS VERSUS MELANOMAS PRIMARIOS QUE CURSAN CON METÁSTASIS: .....	139
I.4.3. MELANOMAS PRIMARIOS NO METASTÁTICOS VERSUS MELANOMAS PRIMARIOS METASTÁSICOS: ....	139
I.4.3.1. Estudio de expresión de ARN por PCR .....	139
I.4.3.1.1. Metástasis a distancia.....	139
I.4.3.1.2. Metástasis ganglionares .....	140
I.4.3.1.3. Metástasis en tránsito.....	140
I.4.3.2. Resultados del estudio inmunohistoquímico, en melanomas que dieron metástasis: .....	141
I.4.3.2.1. Metástasis ganglionares .....	141
I.4.3.2.2. Metástasis a distancia.....	142
<b>I.5. ESTUDIO DE INTERVALO LIBRE DE METÁSTASIS A DISTANCIA Y DE SUPERVIVENCIA: .....</b>	<b>147</b>
I.5.1. INTERVALO LIBRE DE METÁSTASIS A DISTANCIA (EN VARIABLES POR PCR) .....	147
I.5.2. INTERVALO LIBRE DE METÁSTASIS A DISTANCIA (EN VARIABLES IHQ).....	148
<b>I.6. MODELOS PREDICTIVOS: REGRESIÓN LOGÍSTICA Y ÁREAS BAJO CURVA .....</b>	<b>151</b>
I.6.1. ÁREAS BAJO LA CURVA PARA METÁSTASIS A DISTANCIA (TABLA 45, FIG. 47).....	151
I.6.2. REGRESIÓN LOGÍSTICA.....	153
<b>I.7. CORRELACIONES ENTRE LAS VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS Y LAS VARIABLES DE EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-PCR.....</b>	<b>153</b>
I.7.1. RESULTADOS CD34 .....	153
I.7.2. RESULTADOS CD133.....	155
I.7.3. RESULTADO DEL RESTO DE VARIABLES. ....	155
<b>I.8. CORRELACIÓN DE LOS MARCADORES DE EMT Y CMC CON EL ESTADO MUTACIONAL DE BRAF Y NRAS .....</b>	<b>157</b>
I.8.1. ESTUDIO POR RT-PCR DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MARCADORES DE EMT Y CMC: .....	157
I.8.2. PERFIL INMUNOFENOTÍPICO PARA MARCADORES DE EMT Y CMC .....	157

<i>I.8.2.1. Estado mutacional de BRAF:</i> .....	157
<i>I.8.2.2. Estado mutacional de NRAS:</i> .....	158
I.8.3. ESTADO MUTACIONAL DE BRAF Y NRAS EN FUNCIÓN DE LAS VARIABLES CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS: .....	158
<b>II.-ESTUDIO DE TUMORIGENICIDAD EN LAS LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA.....</b>	<b>159</b>
<b>II.1-ESTUDIO DE LA TUMORIGENICIDAD DE LÍNEAS CELULARES PROCEDENTES DE MELANOMA PRIMARIO (WM-115) Y DE SU METÁSTASIS (WM-266-4).....</b>	<b>159</b>
<b>II.2. TUMORIGENICIDAD DE LA LÍNEA SK-MEL-28 EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD133 Y DE LA LÍNEA CD133+ MEL-RC-08.....</b>	<b>163</b>
<b>II.3. TUMORIGENICIDAD DE LAS CÉLULAS CD133+ Y CD133-, OBTENIDAS POR SEPARACIÓN MAGNÉTICA A PARTIR DE LA LÍNEA SK-MEL-28 Y COMPARACIÓN CON LAS LÍNEAS SK-MEL-28 Y MEL-RC08.....</b>	<b>164</b>
II.3.1. MARCADORES DE EMT EN LOS XENOTRASPLANTES .....	168
II.3.2. MARCADORES DE CMC EN LOS XENOTRASPLANTES:.....	169
<b>III. DESARROLLO ARGUMENTAL .....</b>	<b>171</b>
<b>III.1. FACTORES DE EMT Y MARCADORES DE CMC EN RELACIÓN CON LOS PARÁMETROS CLÁSICOS DE PROGRESIÓN LOCAL.....</b>	<b>171</b>
<b>III.2. EXPRESIÓN DE FACTORES DE EMT Y MARCADORES DE CMC EN RELACIÓN CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES.....</b>	<b>174</b>
<b>III.3. MARCADORES DE EMT Y CMC EN LAS DIFERENTES FASES EVOLUTIVAS DE PROGRESIÓN TUMORAL.....</b>	<b>176</b>
<b>III.4. MARCADORES DE EMT Y CMC EN RELACIÓN CON EL ESTADO MUTACIONAL DE BRAF Y NRAS .....</b>	<b>178</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>179</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>183</b>
<b>6. ANEXOS .....</b>	<b>201</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestras estudiadas en este trabajo .....	62
Tabla 2. Anticuerpos utilizados .....	69
Tabla 3: Composición de la mezcla de reacción de la RT. ....	78
Tabla 4. Condiciones del ciclo térmico de la RT. ....	79
Tabla 5 . Mezcla re reactivos necesarios para la RT-PCR. *El ADNc procede de la retrotranscripción de 300 ng de RNA totales.....	80
Tabla 6. Programa térmico.....	80
Tabla 7. Descripción de las sondas TaqMan empleadas. ....	81
Tabla 8. Mezcla de reacción para PCR de los exones estudiados de los genes BRAF y NRAS. ....	84
Tabla 9. Ciclo térmico PCR exón 15 gen BRAF.....	85
Tabla 10. Ciclo térmico PCR exones 2 y 3 gen NRAS. ....	85
Tabla 11. Secuencia de cebadores empleados para la amplificación genes BRAF y NRAS. .....	85
Tabla 12. Composición mezcla de secuenciación. *El volumen de agua a añadir varía en función del volumen de producto de PCR añadido.....	88
Tabla 13. Programa ciclo térmico secuenciación de marcaje para secuenciación.....	88
Tabla 14.-Línea inoculada, vía de inoculación y expresión de CD133 en la experiencia con ratones nude L3.....	94
Tabla 15. Línea celular, vía de inoculación y expresión de CD133 en los xenotransplantes de los ratones L4, tras separación magnética .....	96
Tabla 16. Test paramétricos.....	99
Tabla 17. Test no paramétricos.....	100
Tabla 18. Características histológicas y clínicas en los melanomas primarios seleccionados para el estudio. ....	105
Tabla 19. Seguimiento clínico de los casos estudiados .....	106
Tabla 20. Relación entre la intensidad de tinción para cadherina-N y la fase de crecimiento .....	107
Tabla 21. Variables IHQ de EMT en relación con la fase de crecimiento tumoral .....	107
Tabla 22. Comparación de la expresión génica de marcadores de EMT, en la fase radial y en la fase vertical (Test de Mann Withney). (Se reflejan únicamente los parámetros con significación estadística). ....	109
Tabla 23. Correlación entre la expresión de ON/SPARC, y las fases evolutivas (tipos). .....	110
Tabla 24. Relación entre la intensidad de inmunotinción con OP, y la fase de evolución tumoral: .....	112
Tabla 25. Diferencias en la tinción citoplasmática de cadherina-N para las fases de evolución.....	113
Tabla 26. Correlación entre la intensidad de inmunotinción para cadherina-N y las fases de evolución.....	114
Tabla 27. Diferencias en la expresión nuclear de Twist para las fases de evolución del melanoma. ....	115
Tabla 28. Estudio de la intensidad de inmunotinción para Twist citoplasmático en las diferentes fases de evolución .....	115

Tabla 29. Correlación de la expresión nuclear de Snail por inmunohistoquímica con las fases de evolución.....	116
Tabla 30. Correlación entre variables IHQ de EMT cuantitativas y parámetros pronósticos clásicos. ....	119
Tabla 31. Correlación entre variables IHQ cualitativas de EMT, y variables clínicas con valor pronóstico (índice de Breslow, nivel de Clark e índice mitótico) .....	120
Tabla 32. Estudio de la expresión de genes de EMT en función de las variables pronósticas: índice de Breslow, nivel de Clark e índice mitótico. (Correlación de Pearson) .....	121
Tabla 33. Variables IHQ de EMT en relación con la ulceración en melanomas primarios .....	124
Tabla 34. Correlación entre los parámetros IHQ de CMC cuantitativos, y las fases evolutivas. ....	127
Tabla 35. Correlación entre variables IHQ cuantitativas de CMC y variables con valor pronóstico: índice de Breslow, nivel de Clark e índice mitótico. (Correlación de Pearson) .....	131
Tabla 36. Correlación entre variables IHQ cualitativas de CMC y variables con valor pronóstico: índice de Breslow, nivel de Clark e índice mitótico. ....	131
Tabla 37. Correlación entre la expresión de ARNm de marcadores de CMC y variables con valor pronóstico: índice de Breslow, nivel de Clark e índice mitótico.....	132
Tabla 38. Marcadores de EMT y CMC con correlación significativa con el desarrollo de metástasis a distancia .....	139
Tabla 39. Correlación entre la expresión IHQ de marcadores de EMT y desarrollo de metástasis ganglionares.....	142
Tabla 40. Correlación entre la expresión IHQ de marcadores de CMC y desarrollo de metástasis ganglionares.....	142
Tabla 41. Correlación entre la expresión IHQ de marcadores de EMT y desarrollo de metástasis a distancia .....	143
Tabla 42. Correlación entre la expresión IHQ de marcadores de CMC y desarrollo de metástasis a distancia .....	143
Tabla 43. Correlación entre variables IHQ cualitativas y desarrollo de metástasis a distancia .....	143
Tabla 44. Expresión de marcadores de EMT y CMC en el estudio IHQ y RT-PCR, en relación con la localización de las metástasis a distancia .....	146
Tabla 45. Área bajo la curva (curvas COR) e intervalos de confianza para las variables asociadas a metástasis a distancia .....	152
Tabla 46. Correlación entre la expresión IHQ de CD34 y la expresión de ARNm de los genes de EMT y CMC.....	154
Tabla 47. Correlaciones entre los parámetros inmunohistoquímicos y la expresión de los genes de EMT y CMC .....	156
Tabla 48.-Correlaciones paramétricas entre variables inmunohistoquímicas de TEM y CMC , y la expresión de los genes estudiados.....	156
Tabla 49. Correlación entre la mutación de BRAF y la tinción IHQ para marcadores de EMT y CMC .....	158
Tabla 50. Evolución del peso de los ratones xenotransplantados con la línea WM-115 procedente de melanoma primario .....	160

Tabla 51. Evolución del peso en ratones xenotransplantados con la línea WM-266-4 procedente de un melanoma metastásico .....	160
Tabla 52. Tamaño del tumor obtenido a partir de las células inoculadas con la línea WM-266-4 (melanoma metastásico) .....	160
Tabla 53. Tamaño tumoral en el momento del sacrificio de los ratones inoculados con la línea WM-115 (melanoma primario).....	161
Tabla 54. Características histopatológicas de los tumores xenotransplantados con la línea derivada de melanoma primario WM-115 (L1) .....	162
Tabla 55. Características histopatológicas de los tumores xenotransplantados con la línea derivada de melanoma metastásico WM166-4 (L2) .....	163
Tabla 56. Tabla de evolución del peso de los ratones nude L3 tras inoculación intravenosa e intramuscular/subcutánea de células SK-MEL-28 CD133+, SK-MEL-28 CD133-, y Mel-RC-08 .....	164
Tabla 57. Evolución del volumen tumoral de los xenotransplantes en los ratones L4	165
Tabla 58. Expresión de marcadores de EMT y célula madre en los tumores obtenidos por xenotransplante, mediante citometría de flujo.....	167



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de los avances en los biomarcadores pronósticos del melanoma (Mario Mandala, Daniela Massi, Virchow Arch 2014; 464: 265-281) .....	34
Figura 2. Principales biomarcadores pronósticos descritos en el melanoma cutáneo primario, siguiendo los criterios REMARK, agrupados en función de su huella en el cáncer (Tomado de Mandalà et al. <sup>35</sup> ).....	40
Figura 3. A. Imagen del aparato MTA-1, empleado para la confección de las matrices tisulares. B. Ejemplo de laminillas con cortes de los TMA obtenidos .....	66
Figura 4. Ejemplo de inmunotinciones obtenidas.....	74
Figura 5. Técnica de la PCR .....	84
Figura 6. Imagen de las células de las líneas WM-266 y MEL-RC-08 en cultivo .....	92
Figura 7. Intensidad de tinción frente a cadherina-N en melanomas en función de la fase de crecimiento.....	107
Figura 8. Tinción inmunohistoquímica para Cadherina-N en melanomas primarios en fase radial y vertical .....	108
Figura 9.A Porcentaje de células positivas frente a osteonectina (ON/SPARC) en función de la fase de crecimiento. 2B: Proporción de células con positividad mayor o igual al 90% para ON/Sparc. ....	108
Figura 10. Tinción inmunohistoquímica para osteopontina/SPARC en melanomas primarios en fase radial (A) y vertical (B). ....	108
Figura 11. Expresión de SPARC, FN1, Spp1 en función de la fase de crecimiento .....	109
Figura 12. Porcentaje de células tumorales con tinción citoplasmática frente a osteonectina/SPARC en las distintas fases de diseminación .....	111
Figura 13. Tinción inmunohistoquímica para ON/SPARC en melanoma primario y metástasis ganglionar .....	111
Figura 14A. Intensidad de tinción y porcentaje de células positivas frente a Osteopontina en las diferentes fases de diseminación del melanoma. 13B. Porcentaje de células con tinción para osteopontina. ....	112
Figura 15. Tinción inmunohistoquímica para Osteopontina en melanomas primarios y metástasis .....	113
Figura 16. Intensidad de tinción citoplasmática frente a cadherina-N en las diferentes fases de diseminación del melanoma .....	114
Figura 17. Tinción nuclear frente a Twist en las diferentes fases de diseminación del melanoma .....	116
Figura 18. Tinción nuclear de Snail en las diferentes fases de diseminación del melanoma .....	117
Figura 19. Expresión de los genes CDH1, CDH2, FN1, SPARC, y SPP1 en función de la fase evolutiva del melanoma. ....	118
Figura 20. Intensidad de inmunotinción frente a Osteopontina en función del Índice de Breslow. ....	122
Figura 21. Tinción inmunohistoquímica frente a Osteopontina en melanoma delgado (Breslow <1mm) y grueso (Breslow >0 = a 1).....	122
Figura 22. Expresión por RT-PCR de los genes SPP1, CDH2, FN1, SNAIL1, SNAIL2, SPARC, ABCB5, ABCG2 en función del Índice de Breslow.....	123
Figura 23. Porcentaje de células tumorales con inmunotinción citoplasmática frente a fibronectina y osteonectina/SPARC, en función de la presencia de ulceración....	124

Figura 24. Expresión por RT-PCR de los genes de EMT (SPARC, FN1, SPP1 y CDH2 en función de la existencia de ulceración .....	125
Figura 25. Expresión de ARNm de CD34 en función de la fase de crecimiento (radial o vertical) de los melanomas primarios .....	126
Figura 26. Porcentaje de células con inmunopositividad frente a CD133 en las diferentes fases de diseminación.....	128
Figura 27. Porcentaje de células con tinción citoplasmática frente a ABCB5 en las diferentes fases de diseminación del melanoma.....	128
Figura 28. Expresión por RT-PCR de marcadores de CMC (ABCB5, ABCG2, PROM1 Y CD34) en las diferentes fases de diseminación del melanoma.....	130
Figura 29. Expresión del ARNm de ABCG2, PROM 1(CD133) Y CD34 en función del índice de Breslow. ....	133
Figura 30. Expresión del ARNm de ABCB5 y CD34 en función de la presencia de ulceración en los melanomas primarios. ....	134
Figura 31. Comparación de la expresión de genes de EMT (CDH2, FN1, SPARC, SPP1) Y CMC (ABCB5, CD34) por RT-PCR en melanomas primarios y metástasis.....	137
Figura 32. Expesión inmunohistoquímica e ABCB5 y osteonectina/SPARC en tumores primarios y metástasis .....	138
Figura 33. Inmunotinción para ABCB5 en tumor primario (A) y metástasis (B) (100x)	138
Figura 34. Inmunotinción para ON en melanomas primarios (A) y metastásicos (B) (100x) .....	138
Figura 35.-Amplificación de la expresión de ABCB5 en melanomas primarios con y sin metástasis a distancia .....	140
Figura 36. Expresión de los genes FN1, SPARC, SPP1, ABCG2 Y CD34 en melanomas primarios con y sin metástasis .....	141
Figura 37. Porcentaje de células positivas frente a osteonectina/SPARC en melanomas primarios con y sin metástasis .....	144
Figura 38. Intensidad de inmunotinción frente a CD133 en melanomas primarios que dan metástasis en su evolución frente a melanomas primarios que no las dan .	144
Figura 39. Tinción inmunohistoquímica para CD133 en melanomas primarios sin metástasis a distancia y con metástasis a distancia.....	145
Figura 40. Inmunotinción nuclear para CD34 en melanoma primario con metástasis	145
Figura 41. Periodo libre de metástasis a distancia en función de la expresión de ABCG2 por PCR (en verde los melanomas que expresan ABCG2).....	147
Figura 42. Periodo libre de metástasis a distancia en función de la expresión de CD34 por PCR. (en verde los melanomas con expresión de CD34) .....	147
Figura 43. Curva de periodo libre de metástasis en función de la expresión osteonectina/SPARC (en verde los casos que expresan las variables estudiadas) .....	148
Figura 44. Curva de periodo libre de metástasis a distancia en función de la expresión nuclear de CD34 (en verde los melanomas que expresan CD34 nuclear) .....	149
Figura 45. Curva de periodo de supervivencia en función de la expresión de CD133 en más del 95% de la celularidad .....	150
Figura 46. Curva de periodo de supervivencia en función de la expresión de ON/SPARC en más del 95% de la celularidad .....	150
Figura 47. Valor predictivo para metástasis a distancia de los melanomas primarios. A: Curva COR; B: área bajo la curva (ABC) .....	151

Figura 48. Necropsia de los ratones L4. ....	166
Figura 49. Tumores obtenidos a partir de xenotransplantes.....	166
Figura 50. Imagen histológica de la metástasis obtenida en L4R2(A), y del tumor subcutáneo en L4R16 (B) (H.E 200x) .....	167
Figura 51. Imagen de los cultivos celulares obtenidos a partir de los tumores xenotransplantados en L4R2 (A) y L4R16 (B). ....	168





## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**ABC:** familia de transportadores de cassette de unión a ATP

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ADN complementario

**AJCC:** *American Joint Committee on Cancer*

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**BRAF:** protooncogen que codifica la proteína B-Raf

**Cadherina-E:** cadherina epitelial

**Cadherina-E (CDH1):** gen de la cadherina epitelial

**Cadherina-N:** cadherina neuronal

**Cadherina-N (CDH2):** gen de la cadherina neuronal

**CD:** *cluster of differentiation*

**CDK2:** kinasa dependiente de ciclina 2

**CKIT:** protooncogen c-kit o CD117 o *tyrosine-protein kinase Kit* o *Mast/stem cell growth factor receptor (SCFR)*

**CMC:** células madre cancerosas

**CMM:** células madre del melanoma

**CXCR4:** receptor de quimiocina CXC tipo 4

**FGF:** factor de crecimiento de los fibroblastos o *fibroblast growing factor*

**E2.2 (o TCF4):** *immunoglobulin transcription factor 2*

**EDTA:** ácido etildiaminotetraacético

**EGF:** factores de crecimiento epidérmico o *epidermal growing factor*

**EMT:** transición epitelio mesenquimal o *endothelial-mesenchymal transition*

**EMT-TFs:** factores de transcripción inductores de EMTIB: índice de Breslow

**FN:** Fibronectina

**GTPasa:** guanosina trifosfatasa o trifosfatasas de guanosina

**IHQ:** inmunohistoquímica

**IM:** índice mitótico

**KLF8:** *Kruppel-like factor 8*

**KW:** Kruskal Wallis

**MC:** melanoma cutáneo

**MCAM:** Molécula de adhesión celular del melanoma

**MD:** metástasis a distancia

**MET:** transición mesenquimal-epitelial, o *mesenchymal-endothelial transition*

**MG:** metástasis ganglionar

**mm:** milímetros

**MMP:** metaloproteinasas de la matriz

**MN:** melanoma nodular

**MP:** melanoma primario

**MT:** metástasis en tránsito

**MW:** Mann Whitney

**N<sub>2</sub>:** nitrógeno

**NRAS:** gen de la familia RAS que codifica la proteína enzimática NRAS

**NV:** no valorable

**ON/SPARC:** osteonectina. Hace referencia a la proteína y al gen.

**OP:** osteopontina. Hace referencia a la proteína

**OP (SPP1):** osteopontina. Hace referencia al gen.

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa o *polymerase chain reaction*

**PBS:** tampón fosfato salino o *phosphate buffered saline*

**PI3K:** *phosphatidylinositol 3' kinase*

**PTEN:** fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

**RT:** transcripción reversa o retrotranscripción

**RT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, en tiempo real

**rpm:** revoluciones por minuto

**sec:** segundos

**SF/HGF:** factor de crecimiento hepatocitario

**TGFβ:** factor transformador de crecimiento β

**TFs:** factores de transcripción o transcription factors

**TMA:** matrices tisulares o tissue microarrays

**UV:** ultravioleta

**ZEB1:** *Zinc finger E-box-binding homeobox 1*

**ZEB2:** *Zinc finger E-box-binding homeobox 2*

## **1. Introducción y revisión bibliográfica**



## 1.INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

### 1.1. INCIDENCIA DEL MELANOMA CUTÁNEO

La mayoría de los estudios epidemiológicos muestran un aumento de la incidencia de melanoma en las poblaciones caucásicas en las últimas décadas, que se ha relacionado fundamentalmente con el cambio en los hábitos de exposición solar. Las incidencias más altas se han registrado en Australia y Nueva Zelanda, con casi 60 casos por 100 000 habitantes por año<sup>1</sup>. Además, su incidencia ha aumentado más rápidamente que la de cualquier otro cáncer en EEUU, con un incremento del 3,1 % ( $p<0,001$ ) anualmente en los últimos 20 años<sup>2</sup>. Estos cambios afectan fundamentalmente al grupo de edad con más de 60 años, particularmente en el sexo masculino, con un incremento de 6.15% (95% intervalo de confianza, 4.31-8.02%) para el periodo comprendido entre 1992 y 2005<sup>3</sup>.

En Europa, las tasas de nuevos casos de melanoma en el 2012, estandarizadas por edad, fueron de 11. 4 por 100 000 para hombres, y 11.0 por 100 000 para mujeres, poniendo de relieve grandes variaciones norte/sur, y este/oeste<sup>4</sup>. De hecho, un análisis reciente de la base de datos GLOBOCAN 2008 confirmó que la tasa de incidencia en la Europa Central y del Este es menos de la mitad que la del Oeste. Esta variación podría explicarse por los distintos fenotipos cutáneos, los distintos hábitos de exposición solar, y las diferencias en latitud y altitud o en índice de radiación ultravioleta, pero también por las diferencias en los programas de registro de enfermedades en los diferentes países<sup>5</sup>. En España, la tasa anual ajustada a la población europea es de 6.14 en hombres y 7.26 en mujeres por 100 000 habitantes<sup>6</sup>

Se han encontrado diferencias en cuanto al género, siendo el melanoma más frecuente en hombres que en mujeres en los EEUU y Australia<sup>7, 8</sup> y en Europa central, del Este y del Sur<sup>9</sup>. Sin embargo, en un análisis reciente de los registros del programa Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) muestra que en menores de 44 años, las mujeres presentan mayores tasas de incidencia, con la diferencia más marcada en

el grupo de edad entre 20 y 24 años, diferencia que no se observa en otros cánceres cutáneos no melánicos relacionados con la exposición ultravioleta (RUV), sugiriendo que otros factores ligados al sexo, como las hormonas, podrían jugar un papel en el desarrollo temprano de melanoma<sup>10</sup>. En España, en el periodo comprendido entre 1997 y 2011, desde la creación del Registro Nacional del Melanoma Cutáneo (RNMC), el melanoma es un 13% más frecuente en mujeres que en hombres<sup>11</sup>.

La localización de los melanomas también varía en relación a la edad, siendo más frecuentes los melanomas de cabeza y cuello en edades avanzadas, y los de tronco y extremidades en jóvenes<sup>12</sup>. Estas diferentes localizaciones se han asociado con diferentes patrones de exposición solar: los melanomas de cabeza y cuello están relacionados con la exposición crónica al sol, y los de tronco con la exposición intermitente y con un contexto de nevus múltiples o atípicos<sup>13</sup>.

En cuanto al espesor de las lesiones en el momento del diagnóstico, los tumores gruesos no han aumentado su proporción en las últimas décadas<sup>11,14</sup>, al contrario que los melanomas finos, que han aumentado su incidencia. Esto podría explicarse en gran medida por la instauración de campañas de concienciación y prevención precoz de melanoma, que permiten su diagnóstico en estadios precoces.

## **1.2.MORTALIDAD DEL MELANOMA CUTÁNEO:**

Aunque el melanoma representa únicamente el 4% de los cánceres cutáneos, es causa del mayor número de muertes relacionadas con el cáncer de piel<sup>14</sup>.

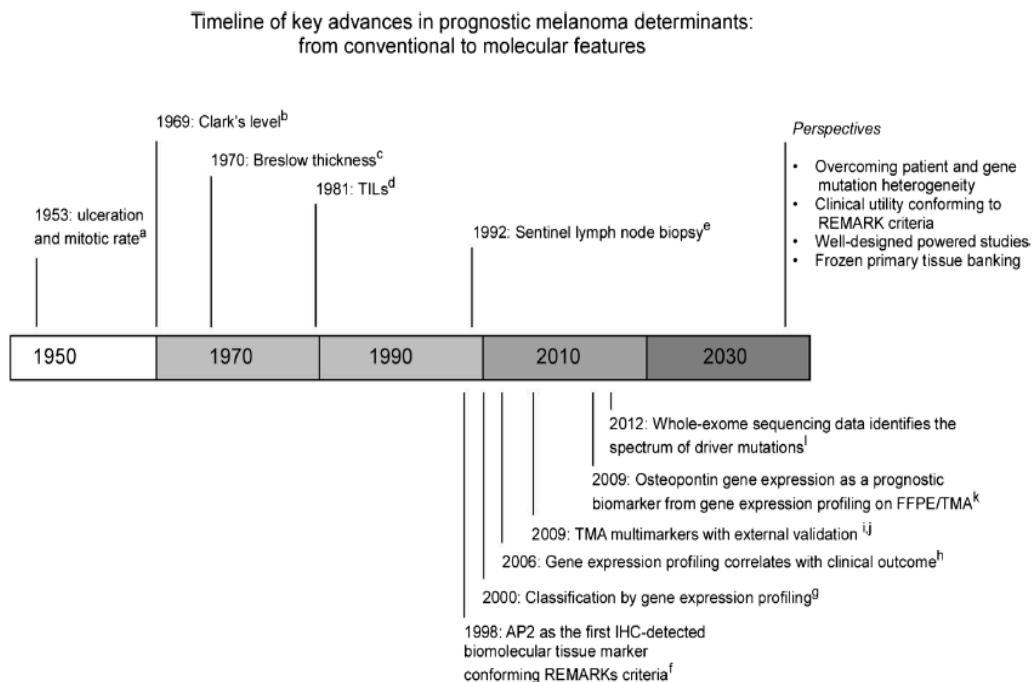
Las tasas de mortalidad permanecen relativamente estables desde la década de los 80, a pesar del aumento de su incidencia. Como se ha comentado previamente, numerosos estudios muestran una tendencia similar al incremento de la incidencia de melanomas finos en distintas localizaciones geográficas<sup>11, 15, 16</sup>. Esto no parece deberse únicamente al diagnóstico precoz de las lesiones, sino que se cita la detección de tumores biológicamente menos agresivos con menor riesgo metastásico<sup>16</sup>. No obstante, en el grupo poblacional constituido por hombres de edad avanzada, se observa una mayor incidencia de melanomas gruesos, frecuentemente en el área de

cabeza y cuello, y una mayor mortalidad<sup>17, 18, 19</sup>. Estos hechos se explican en parte por una menor preocupación cosmética en este grupo de edad, y por la tendencia a evitar las revisiones médicas, pero sobre todo, se ha postulado que podrían tener un comportamiento biológico diferente, por la biología intrínseca del tumor y por la alteración de los mecanismos de defensa del huesped<sup>20</sup>.

### **1.3. FACTORES PRONÓSTICOS DEL MELANOMA PRIMARIO:**

Los parámetros histopatológicos que predicen el pronóstico de los melanomas cutáneos primarios se han estudiado durante décadas, y se recogen en el sistema de estadaje del American Joint Committee on Cancer (AJCC). Pero basándonos únicamente en estos criterios morfológicos y morfométricos, se observa que la posibilidad de recaída no difiere mucho entre los estadios T2 y T3, y en los melanomas delgados (<1mm, T1a o T1b) el riesgo de recurrencia varía entre un 1 y un 12%<sup>21</sup>. Estas observaciones apoyan la heterogeneidad de los melanomas, que tienen comportamientos biológicos diferentes. Es por tanto necesario identificar nuevos factores pronósticos que ayuden a tomar decisiones terapéuticas. En esta línea, y con el desarrollo de nuevas tecnologías, se han identificado perfiles moleculares exclusivos y patrones mutacionales (ADN), así como perfiles de expresión génica (ARN) en las células de melanoma. La figura 1 muestra un digrama de la evolución en el tiempo de los biomarcadores con valor pronóstico en el melanoma.

**Figura 1. Diagrama de los avances en los biomarcadores pronósticos del melanoma (Mario Mandala, Daniela Massi, Virchows Arch 2014; 464: 265-281)**



### 1.3.1. Marcadores pronósticos tisulares convencionales

#### 1.3.1.1. Índice de Breslow (IB)

Se trata de una técnica reproducible basada en la medición en mm del espesor tumoral, desde el punto de máxima infiltración, hasta la última célula viva en la superficie epidérmica. Fue descrita por Breslow en 1970<sup>22</sup>. Cuando la lesión afecta a los anejos se considera componente in situ, salvo que haya extensión perianexial. En estos casos, se acepta en general que se debe medir, en caso de que sea el único componente infiltrante, desde la vaina externa del folículo o la superficie luminal de la glándula sudorípara. Otros problemas de interpretación surgen cuando no está clara la naturaleza del componente infiltrante (melanoma versus nevus asociado) o en tumores con un crecimiento exofítico o patrón verrucoso. Se aconseja informar también el espesor en las zonas de regresión, sabiendo que no representa el verdadero IB.

Este índice muestra una excelente correlación con la mortalidad, siendo el pronóstico progresivamente peor al aumentar el espesor tumoral, hasta alcanzar los 8 mm, donde la curva se aplana sin alcanzar el 100% de mortalidad<sup>23</sup>. Los datos de la AJCC confirman



que el IB se correlaciona con una significativa disminución de la tasa de supervivencia a los 5 y 10 años. Entre los pacientes con melanomas en estadio T1 ( $\leq 1$  mm de espesor), la supervivencia a los 10 años es del 92%, pero sólo del 80%, 63% y 50%, en pacientes con estadios T2 (1,01 a 2 mm), T3 (2,01 a 4mm) y T4 ( $>4$ mm) respectivamente<sup>23</sup>.

### 1.3.1.2. Índice mitótico (IM)

Basándose en el análisis multivariable de 13 296 pacientes con melanomas en estadio I y II, extraídos de la base de datos de melanoma de la AJCC<sup>24</sup>, donde se señaló el IM como el segundo factor pronóstico más importante tras el espesor tumoral, en el año 2010, el recuento de mitosis se incluye en el subestadiaje patológico de los melanomas pT1<sup>23</sup>. El impacto pronóstico más fuerte se observó en este grupo de tumores (T1), aunque también era significativo en tumores más gruesos. Actualmente, se recomienda que en los informes patológicos de todos los melanomas infiltrantes, independientemente de su espesor, se incluya el número de mitosis/mm<sup>2</sup>, teniendo en cuenta únicamente el componente intradérmico de la lesión, empezando a contar en el área con mayor actividad mitótica (*“hot spot”*).

### 1.3.1.3. Ulceración

La ulceración ha demostrado ser un factor pronóstico independiente del espesor tumor, y en el análisis del sistema de estadiaje en vigor de la AJCC, es el tercer factor de predicción de supervivencia más importante<sup>23</sup>. Por tanto, se debe evaluar microscópicamente la presencia de ulceración en todo melanoma primario cutáneo, entendiendo la ulceración como: 1) defecto de la epidermis afectando a todo su espesor (incluyendo estrato córneo y membrana basal), 2) cambios reactivos (fibrina y neutrófilos), 3) adelgazamiento, borramiento o hiperplasia reactiva de la epidermis adyacente, en ausencia de traumatismo o cirugía previa. Recientemente, se ha reportado que la extensión de la úlcera, ya sea indicando su diámetro o el porcentaje

con respecto a la anchura del tumor, otorga un valor pronóstico con mayor precisión que la existencia o no de la misma<sup>25</sup>, aunque todavía no se incluye este parámetro en el estadiaje.

#### 1.3.1.4. Linfocitos intratumorales

En las muestras tumorales de melanoma se reconoce clásicamente la presencia de infiltrados linfocitarios. En 1981, Day y colaboradores<sup>26</sup> describieron un mejor pronóstico en los melanomas con infiltrado linfocitario intratumoral que en aquellos que no lo tenían. Más tarde, Clark y colaboradores<sup>27</sup> clasificaron los infiltrados linfocitarios intratumorales en tres tipos en función de su intensidad y distribución, como (1)intenso ("*brisk*") (cuando los linfocitos se disponen a lo largo de todo el tejido de la fase vertical, o cubriendo toda la base), (2)no intenso ("*non-brisk*")(cuando los linfocitos se disponen dispersos o focalmente en la periferia, y (3)ausente (cuando no hay linfocitos o no infiltran el melanoma). Demostraron que estos infiltrados tenían un significado pronóstico cuando se observaban en la fase vertical, pero no en la fase radial.

Más recientemente, Azimi et al. proponen un sistema de grados basado en la distribución y la densidad del infiltrado linfocitario. Con este sistema, demostraron que el infiltrado linfocitario es un predictor independiente de supervivencia y estado del ganglio centinela en pacientes con melanoma<sup>28</sup>. Describieron que la ausencia de infiltrado linfocitario predice la positividad del ganglio centinela. Sin embargo, a pesar de la presencia de infiltrado linfocitario algunos melanomas progresan. Las complejas interacciones entre las células tumorales y el huésped son fruto de constantes investigaciones, y en otros campos de la patología se está estudiando no solo la intensidad y la distribución de los linfocitos, sino también la caracterización molecular de los mismos.

#### 1.3.1.5. Nivel de Clark

En 1969, Clark et al. Establecieron una clasificación del melanoma basada en el nivel de invasión de las diferentes capas histológicas de la piel, demostrando que el nivel de infiltración se correlacionaba con la supervivencia<sup>29</sup>. En el nivel I, el melanoma queda limitado a la epidermis (in situ), y no tiene riesgo de metástasis a distancia. En el nivel II, existe una extensión superficial a la dermis papilar, que todavía confiere un excelente pronóstico. El nivel III representa la infiltración y distensión de la dermis papilar sin llegar a la dermis reticular, el nivel IV, la invasión de la dermis reticular, y el nivel V, la del tejido celular subcutáneo, y constituyen un aumento progresivo del riesgo de metástasis y mortalidad.

En la clasificación de la AJCC de 2010, el nivel de Clark ya no se incluye como criterio de estadiaje porque no resultó ser independiente en el estudio multivariable al considerar el IM. Por este motivo se reemplazó el nivel de Clark por el IM para subclasificar los melanomas pT1, en pT1a y pT1b. No obstante, se sigue utilizando como criterio terciario, y se subclasifican como melanomas pT1b los MM con nivel de Clark IV o V, en casos sin ulceración donde no puede determinarse el IM. Se recomienda incluir siempre este parámetro en los informes con diagnóstico de melanoma.

#### 1.3.1.6. Fase de crecimiento tumoral

La fase radial se caracteriza por la proliferación de melanocitos en la epidermis y la dermis papilar, con desorganización arquitectural y atipia citológica, sin conformar agregados cohesivos, transmigración epidérmica y extensión lateral asimétrica. Durante la fase vertical el melanoma adquiere un mayor potencial de metástasis, y se caracteriza por la presencia de agregados cohesivos, o nódulos, de mayor tamaño que los superficiales, y /o por la presencia de mitosis en el componente invasivo.

### 1.3.1.7. Regresión

La regresión supone la sustitución parcial o completa de las células tumorales por fibrosis, un incremento de la vascularización y presencia de melanófagos, con un infiltrado linfocitario asociado de densidad variable. Se considera extensa, dependiendo de los autores, cuando supera el 50%, o el 75% de la lesión. Es un proceso dinámico, con una fase inicial, una fase intermedia, y una fase tardía. Su significado pronóstico está sujeto a constantes controversias. Existen diversos estudios que demuestran que la regresión es un factor de mal pronóstico en el melanoma cutáneo, especialmente en melanoma delgados. Olah et al. analizaron 134 pacientes con melanomas con índice de Breslow  $\leq 2\text{mm}$  a los que se les había realizado estudio del ganglio centinela, y apreciaron un mayor riesgo de metástasis ganglionar en el grupo de pacientes con regresión (64%) que en aquellos sin regresión (15%)<sup>30</sup>. Sin embargo, otros estudios asocian la existencia de regresión a una activación de la respuesta inmune en el huésped frente a la celularidad tumoral, y a un pronóstico favorable, sin que asocie un aumento del riesgo de metástasis ganglionar. Merece especial interés el trabajo de Ribero et al, que con una casuística amplia de 1693 pacientes con melanoma en estadios I y II, analizaron el ganglio centinela en 182 de 349 pacientes con regresión en el tumor primario (52,1%), y en 474 de 1344 (35,3%) melanomas sin regresión. La presencia de regresión histológica se asoció de forma significativa con una disminución del riesgo de progresión del melanoma, y con una menor incidencia de metástasis en tránsito, ganglionares y a distancia<sup>31</sup>.

### 1.3.1.8. Invasión linfovascular

La demostración de células de melanoma dentro de las luces vasculares, linfáticas y/o sanguíneas es un hallazgo poco frecuente en las biopsias excisionales de melanoma cutáneo (alrededor de un 8%)<sup>32</sup>, y se considera un marcador de mal pronóstico<sup>33</sup>.

#### 1.3.1.9. Satelitosis

La satelitosis se define como la existencia de metástasis microscópicas, cutáneas o subcutáneas, de más de 0,05 mm de diámetro, separadas por tejido normal y a más de 0,3 mm de distancia de la masa tumoral principal. Se consideran depósitos de células tumorales localizadas en el sistema linfático entre la lesión principal y los ganglios linfáticos regionales, y su presencia supone un mayor riesgo de recurrencia regional y sistémica.

#### 1.3.1.10. Tipo histológico

Los subtipos histológicos clásicos de melanoma (melanoma de extensión superficial, melanoma nodular, melanoma lentiginoso acral, y melanoma sobre lentigo maligno) son de escaso o nulo valor pronóstico independiente de su espesor. Además su interpretación es observador dependiente, y queda sujeta a la experiencia del patólogo que realice el estudio. La tendencia actual es a clasificarlos en función de la exposición solar de la localización donde se encuentran.

#### 1.3.1.11. Metástasis ganglionar

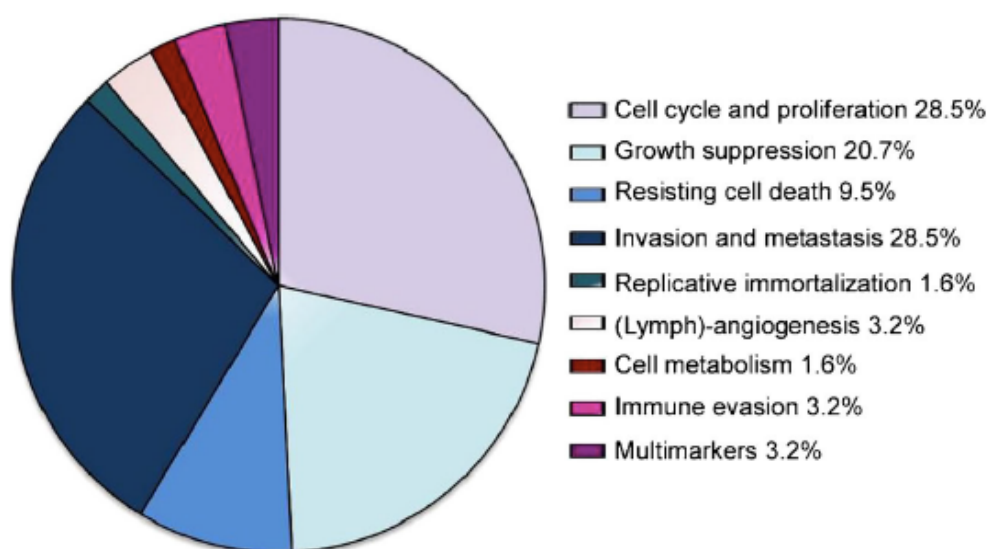
El melanoma metastatiza generalmente por vía linfática, y el estado de los ganglios regionales se considera el factor pronóstico más importante en los pacientes con melanoma localizado. La técnica del ganglio centinela se desarrolló como una técnica de rutina estandarizada en pacientes con criterios clínicos o histopatológicos de mal pronóstico. El objetivo de esta técnica es detectar la presencia de metástasis o micrometástasis en piezas de linfadenectomía selectiva. De acuerdo con la clasificación de la AJCC de 2010, se consideran micrometástasis aquellas que se detectan por linfadenectomía selectiva o técnica de ganglio centinela, mientras que las macrometástasis son aquellas sospechadas clínica o radiológicamente y confirmadas histológicamente. Dependiendo de los criterios de inclusión de los pacientes y de los

protocolos de estudio histológico, la positividad del ganglio centinela oscila entre un 15% y un 33% <sup>34</sup>.

### 1.3.2. Biomarcadores pronósticos

En las últimas décadas se han realizado estudios sobre el valor predictivo de diversos biomarcadores en pacientes con melanoma, con resultados poco concluyentes. Mandalà y colaboradores<sup>35</sup>, basándose en un metaanálisis reciente de 1797 artículos que describen nuevos biomarcadores con valor predictivo en el melanoma, vieron que sólo 37 estudios de cohortes, siguieron los criterios REMARK establecidos por Gould Rothberg y colaboradores<sup>36</sup>. Se han realizado estudios que incluyen marcadores de la proliferación y del ciclo celular (Ki67, BCL6, p53, Her3), supresores del crecimiento (AO2, HDM2, p16), marcadores de resistencia a la muerte celular (BCL2, TNF $\alpha$ , survivina), marcadores de invasión y metástasis (integrinas, CD44, MCAM, cadherina-E, cadherina-P, CXCR4), y marcadores de inmortalización replicativa, angiogénesis, metabolismo celular y evasión de la respuesta inmune (Fig.2). Actualmente, no se reconoce la utilización de ninguno de estos biomarcadores en la rutina diagnóstica con valor pronóstico<sup>35</sup>.

Figura 2. Principales biomarcadores pronósticos descritos en el melanoma cutáneo primario, siguiendo los criterios REMARK, agrupados en función de su huella en el cáncer (Tomado de Mandalà et al.<sup>35</sup>)



### 1.3.3. Firmas genéticas

Los avances en tecnología transcripcional y la genómica han hecho posible el estudio de firmas de expresión y del estado mutacional de los tumores, lo que permite subclasificar los melanomas con mayor exactitud desde un punto de vista diagnóstico y pronóstico. Desde la publicación en el año 2000 de dos subtipos moleculares de melanoma con implicación pronóstica<sup>37</sup>, se han realizado numerosos estudios analizando la expresión génica en los melanomas, intentando definir perfiles con significación pronóstica. En 2012, el grupo de Giacomini revisó los estudios moleculares realizados en el melanoma<sup>38</sup>. En una revisión de más de 100 artículos seleccionaron 14 que hacían hincapié en la evolución del paciente, y expusieron las causas de la falta de consenso entre grupos, concluyendo que las clases moleculares todavía no serían de uso rutinario. Recientemente, Gerami y colaboradores, definen una firma genética basada en la expresión de 31 genes (22 de ellos relacionados con el melanoma cutáneo, y 9 de ellos con el melanoma uveal) entre los que se encuentran representados genes relacionados con el proceso biológico del desarrollo tisular y diferenciación epitelial, y genes relacionados con la unión intercelular, para clasificar los melanomas en bajo y alto riesgo, con diferencias significativas en la supervivencia<sup>39</sup>. Además, en una publicación posterior, muestran que el valor predictivo del perfil genético de riesgo es mayor que el del estado del ganglio centinela<sup>40</sup>.

### 1.3.4. BRAF/NRAS

El melanoma cutáneo es una entidad heterogénea desde el punto de vista genético, y las alteraciones genéticas pueden ser de utilidad para su subclasificación. Son frecuentes las mutaciones como pérdida de PTEN (25-50%), y la amplificación del factor de transcripción asociado a la microoftalmia (MITF; 10-15%), de CDK2 (20%) y de ciclina D (30%)<sup>41</sup>. C-KIT se encuentra mutado en un 20-40% de los melanomas acrales y de mucosas<sup>41</sup>. La mayoría de los melanomas primarios presentan mutaciones activadoras en los protooncogenes NRAS (15%) o BRAF (50%), componentes de la vía de transducción de señales RAS-RAF-MEK-ERK<sup>42</sup>. Varios estudios evalúan el impacto de las mutaciones de NRAS y/o BRAF en el pronóstico de los pacientes, sin encontrar

diferencias significativas en la supervivencia de pacientes en estadio III<sup>43</sup> y sin observarse variaciones significativas en la supervivencia global desde el diagnóstico en pacientes con y sin mutaciones de NRAS y BRAF<sup>44</sup>. Sin embargo, otros autores asocian las mutaciones en NRAS con un peor pronóstico de los melanomas. Devitt y colaboradores llevaron a cabo un estudio prospectivo en una cohorte de 249 pacientes, observando que las mutaciones en NRAS se asociaban a una supervivencia más corta, independientemente de su asociación con la presencia de marcadores clásicos de mal pronóstico (grosor e índice mitótico)<sup>45</sup>. En la misma línea, el grupo de Davies identificó las mutaciones en NRAS como un factor predictivo independiente de disminución de la supervivencia tras el diagnóstico en pacientes en estadio V, señalando además, que las mutaciones en BRAF o NRAS se asocian a la afectación del SNC<sup>46</sup>. Más recientemente, se ha descrito una mayor frecuencia de mutaciones de NRAS que de BRAF en melanomas de rápido crecimiento (incremento del grosor en 0,5 mm. o más por mes)<sup>47</sup>.



## 1.4. TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL.

### 1.4.1. Definición

La transición epitelio mesenquimal es el proceso, considerado reversible, por el que una célula epitelial sufre cambios transitorios en la estructura celular y se convierte en una célula mesenquimal con mayor motilidad, y por lo tanto con capacidad migratoria e invasiva.

Como resultado, se produce:

- una alteración en las uniones célula-célula
- una pérdida de la polaridad celular
- expresión de marcadores mesenquimales
- una reorganización del citoesqueleto de actina

Al producirse una pérdida de contacto de las células tumorales con las células vecinas, las células adquieren:

- mayor motilidad
- mayor interacción con la matriz extracelular
- mayor capacidad de invasión y metástasis<sup>48, 49</sup>.

Los factores implicados se utilizan como biomarcadores para demostrar el fenómeno en una célula determinada<sup>50</sup>.

La EMT se describió en primer lugar en procesos fisiológicos, y es esencial para el desarrollo embrionario, ya que participa en la formación del mesodermo y del tubo neural, así como en la miogénesis. También tiene lugar en la cicatrización, fibrosis, así como en procesos patológicos como la progresión tumoral (invasión y metástasis)<sup>51</sup>.

Basándose en el contexto biológico, la EMT se ha dividido en tres tipos: del desarrollo (Tipo I), de la fibrosis y la cicatrización (Tipo II), y del cáncer (Tipo III)<sup>50</sup>.

#### 1.4.2. Regulación de la EMT. Factores implicados

Distintos mecanismos intervienen en la iniciación y ejecución de la EMT, y además estos se superponen con los que controlan la adhesión, la motilidad, la invasión, la supervivencia y la diferenciación<sup>52</sup>. Diferentes activadores extracelulares pueden desencadenar la EMT, y existen numerosos puntos comunes en las diferentes vías de señalización que activan e inhiben la EMT. Además, las vías de señalización que regulan la EMT tienen puntos finales comunes, como por ejemplo, la regulación a la baja de la cadherina-E, y la expresión de los genes asociados a la EMT.

Por otro lado, se ha comprobado *in vivo* que cada evento de EMT está regulado por un conjunto particular de activadores e inhibidores, y además, el efecto generado es dependiente del contexto.

La EMT es desencadenada por una interacción de señales extracelulares, incluyendo componentes de la matriz extracelular, como el colágeno y el ácido hialurónico, así como factores de crecimiento solubles, como miembros de las familias TGF $\beta$  y FGF (factor de crecimiento de los fibroblastos), factores de crecimiento epidérmico (EGF) y SF/HGF.

La señalización mediada por receptores que interactúan con estos ligandos desencadena la activación de moléculas efectoras intracelulares, como miembros de la familia de GTPasa (Ras, Rho y Rac), y miembros de la familia tirosin-kinasa Src. Estos efectores orquestan el desensamblaje de los complejos de unión y los cambios del citoesqueleto durante el proceso de EMT. Además, de la activación de vías de señalización también resulta la activación de reguladores de la transcripción como snail y slug, que regulan los cambios de patrón de expresión génica que subyacen en la EMT.

Una de las dianas fundamentales de estos reguladores de la transcripción es la represión del gen de la cadherina-E, componente fundamental del fenotipo epitelial.

Muchos factores de transcripción (TFs) que pueden inhibir la cadherina-E directa o indirectamente se consideran como EMT-TFs (factores de transcripción inductores de EMT):

-SNAI1/Snail 1, SNAI2/Snail 2 (o Slug), ZEB1, ZEB2, E47 y KLF8 (Kruppel-like factor 8) pueden unirse al promotor de la cadherina-E e inhibir su transcripción,

- Twist, Goosecoid, E2.2 (o TCF4), homeobox protein SIX1 and FOXC2 (fork-head box protein C2) inhiben la cadherina-E indirectamente<sup>53, 54</sup>. La pérdida de cadherina-E (CDH1) se considera un evento fundamental en EMT, y se ha establecido la conexión entre la pérdida de expresión de cadherina-E en las células cancerosas, y su proceso de EMT:

-la inducción del oncogén cFos induce EMT, y se asocia con una disminución de la expresión de cadherina-E<sup>55</sup>. En las células que han sufrido EMT, al perderse completamente la expresión citoplasmática de cadherina-E (que contiene el sitio de unión de la  $\beta$ -catenina), se reorganizan los complejos de unión y se suprime la proliferación celular<sup>55</sup>.

-la anulación del secuestro intracitoplasmático de  $\beta$ -catenina, mediado por cadherina-E., tiene como resultado, que la  $\beta$ -catenina se localice en el núcleo y participe en la vía de señalización de Wnt, activando su regulación transcripcional a través de LEF/TCF4(lymphoid-enhancer-binding-factor/T-cell-factor-4)<sup>52</sup>. El acúmulo de  $\beta$ -catenina, en el núcleo se correlaciona con la susceptibilidad de EMT y de adquisición de un fenotipo invasor.

Los factores SNAIL y ZEB se unen a las secuencias de consenso E-box en la región del promotor, mientras que KLF8 se une al promotor a través de boxes GT. Estos EMT-TF no sólo inhiben directamente la cadherina-E, sino que también inhiben la transcripción de otras proteínas de adhesión, incluyendo claudinas y desmosomas, facilitando así la EMT.

Por otro lado, durante la EMT, son regulados a la baja otros factores de transcripción como grainyhead-like protein 2 homologue (GRHL2), y ETS-related transcription factors ELF3 y ELF5 (que inducen la transición mesenquima-epitelio o MET cuando se sobreexpresan en células mesenquimales)<sup>56, 57</sup>. Se ha demostrado que Ras-MAPK activa Snail y Slug. Slug desencadena la disrupción de los desmosomas, la diseminación celular y la separación parcial entre uniones célula-célula, es decir, la primera fase de la EMT. Pero Slug no puede desencadenar la segunda fase<sup>58</sup> que incluye la inducción

de la motilidad celular, la inhibición de la expresión de citoqueratina, y la activación de la expresión de la Vimentina<sup>59</sup>. Se sabe que Snail y Slug regulan la expresión de isoformas de otro factor de transcripción, p63, requerido para el correcto desarrollo de estructuras epiteliales<sup>60</sup>. La expresión alterada de isoformas de p63 reduciría la adhesión célula-célula, y aumentaría las propiedades migratorias de las células tumorales. El factor p63 estaría involucrado en la inhibición de EMT, y la reducción de ciertas isoformas de p63 puede ser importante en el desarrollo de carcinomas epiteliales<sup>61</sup>. Algunas de estas isoformas se sabe que regulan la expresión de citoqueratinas<sup>62</sup>. Recientemente, la activación del eje (PI3K)/AKT (*phosphatidylinositol 3'kinase*) está emergiendo como regulador de la EMT. También se ha implicado a Hedgehog, factor nuclear kappaB y Activating Transcription Factor 2<sup>63, 64, 65</sup>. La vía de señalización Wnt regula la EMT en la gastrulación, la formación de las válvulas cardíacas, y en el cáncer<sup>66</sup>. La activación de la vía de señalización Wnt en el cáncer de mama induce el regulador de EMT SNAIL, y regula al alza el marcador mesenquimal vimentina. Además, la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenin se correlaciona con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama. Igualmente, TGF- $\beta$  activa la expresión de SNAIL y ZEB para regular la EMT en el desarrollo cardíaco, palatogénesis y cáncer. Las metástasis óseas por cáncer de mama tienen la vía de señalización TGF- $\beta$  activada, lo que contribuye a su aparición<sup>67</sup>.

Por otro lado, p53, un supresor tumoral bien conocido, inhibe la EMT activando la expresión de varios microRNAs (miR-200 y miR-34) que inhiben la producción de proteína ZEB y SNAIL, manteniendo así el fenotipo epitelial<sup>68</sup>.

Además de la disociación de las uniones intercelulares, las células que sufren una EMT tienen que regular el contacto con la matriz extracelular (MEC) mediado por integrinas. Existen muchas interferencias o puntos en común en las vías de señalización de las integrinas y las vías de regulación de la EMT. Por ejemplo, la activación de la EMT a través de TGF $\beta$  vía p38 MAPK, depende de la señalización por  $\beta$ -integrina<sup>69</sup>. En cambio, la expresión de DAB2 (*disabled-2*), una molécula de adaptación que se une a  $\beta$ 1-integrina, inducida por TGF $\beta$ , es requerida para la activación de la integrina, para la formación de adhesiones focales, y la supervivencia celular durante la EMT<sup>70</sup>. Del mismo modo,  $\alpha$ 2 $\beta$  integrina es requerida para el colágeno y para la EMT inducida por

FGF-1<sup>71</sup>. Más recientemente se ha demostrado que la endocitosis de la cadherina-E activa la GTPasaRAP1, una proteína que regula la activación citoplasmática de las integrinas, y que se requiere para la formación de adhesiones focales<sup>72</sup>. Por otro lado, las integrinas pueden causar una regulación a la baja de cadherina-E<sup>52</sup>.

### 1.4.3. EMT en melanoma

En el melanoma, la migración y la invasión parecen ser el resultado de una interacción específica entre las células tumorales y las células estromales<sup>48, 49</sup>, en asociación a la expresión por parte de las células tumorales de una serie de moléculas implicadas en la EMT<sup>49</sup>. Así pues se describen como implicadas en el proceso metastásico del MM<sup>73</sup>.

**Cadherina-N**

**Lumican**

**Glypican**

**Osteonectina/SPARC**

**Osteopontina**

**Metaloproteinasas**

**Integrinas**

Son difíciles de verificar in vivo por el carácter transitorio del proceso, pero los perfiles de expresión identifican una firma molecular asociada al mismo, y el estudio inmunohistoquímico confirma la expresión por parte de las células de al menos: **cadherina-N, osteopontina, glypican 3, osteonectina/SPARC y PKC $\alpha$** <sup>73</sup>.

Destaca la presencia de lo que se ha denominado “**cambio de la clase de cadherina**” (“*switch of Catherine class*”): pérdida de cadherinas epiteliales (cadherina-E) con ganancia de cadherinas neurales (cadherina-N). Las cadherinas son moléculas de adhesión calcio-dependientes, críticas para el desarrollo y mantenimiento de la arquitectura epitelial. Como se describe en los modelos de carcinoma (este en concreto es de mama), la Cadherina-N es una molécula crucial en el evento EMT, y actúa como oncogén en muchos tumores promoviendo la invasión y la progresión<sup>74</sup>.

En este estudio se asocia un aumento de **cadherina-N** con una disminución de cadherina 1 (cadherina-E) como se ha visto en modelos celulares y en el melanoma desmoplásico, confirmando su papel en la progresión del MM, y por primera vez se relaciona con la capacidad de diseminación metastásica<sup>73</sup>.

La vía PI3K/PTEN regula el cambio de cadherina-E a Cadherina-N en melanomas, a través de una regulación al alza transcripcional de **Snail** y **Twist**<sup>75</sup>. Estos autores demuestran que la pérdida o inactividad de PTEN se correlaciona con el cambio en el fenotipo de cadherina durante la progresión del MM. Las células con PTEN nulo o inactivo muestran niveles altos de PKB/AKT fosforilado (PKB-Ser 473-P), niveles indetectables de cadherina-E y niveles altos de Cadherina-N. La reintroducción de PTEN, o el tratamiento con el inhibidor de PI3K Wortmannin, resultó en una reexpresión de cadherina-E y regulación a la baja de Cadherina-N. Este cambio de cadherina está regulado a nivel transcripcional por Twist y Snail, que a su vez están regulados por la vía PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase).

La **osteonectina/SPARC** (o BM40) es una glicoproteína secretada a la matriz extracelular, relacionada con la migración celular, la invasión y la angiogénesis<sup>76</sup>. Promueve la señalización antiapoptótica y la angiogénesis e induce a las metaloproteinasas de la matriz (MMP)<sup>77</sup>. Parece que su expresión se adquiere en estadios precoces de la invasión del MC, observándose en niveles moderados a altos en el MC primario invasor y en metástasis, siendo nulo o bajo en los nevus, nevus displásicos y MC in situ<sup>78</sup>. También se ha implicado en el cambio de fase radial a vertical de los melanomas invasores<sup>79</sup>.

Las **interacciones de la matriz extracelular** están relacionadas con el evento de EMT. **Las integrinas** son una familia de moléculas de adhesión de la superficie celular que coordinan las interacciones célula-célula y célula-matriz. Se identifica una regulación al alza de la integrina  $\alpha V$  (ITGAV) como marcador de metástasis<sup>73, 80</sup>. Están muy relacionadas con la familia de las proteínas MMP, implicadas en la ruptura o descomposición de la matriz extracelular en procesos fisiológicos y en la invasión tumoral y metástasis. Se ha descrito MMP2 (que degrada colágeno tipo IV) y ADAM 9 (desintegrina y metaloproteinasa dominio 9) en asociación con la progresión del melanoma cutáneo.

**ON/SPARC** (Secreted protein acidic and Rich in cysteine), es una glicoproteína de la matriz celular, regulada al alza durante el desarrollo, la reparación del tejido y la remodelación. Interactúa con diferentes componentes de la matriz extracelular. Además modula la actividad del factor de crecimiento y regula la expresión de metaloproteínasa de la matriz. Se ha reportado que su sobreexpresión se asocia con agresividad y alto potencial metastásico en diferentes cánceres en humanos: melanoma, mama, pulmón, esófago, páncreas y vejiga<sup>81, 82, 83, 84, 85, 86</sup>. En la mayoría de los cánceres, SPARC se produce en las células estromales, como fibroblastos y células endoteliales, más que en las propias células tumorales<sup>84, 87, 88</sup> a excepción de los melanomas y los gliomas, donde la expresión de SPARC es muy alta<sup>81, 89</sup>. Su silenciación inhibe el crecimiento de células de melanoma, o inducción del arresto en G1<sup>90</sup>.

#### 1.4.4. EMT y progresión tumoral

La EMT favorece la invasión, paso previo necesario para poder dar metástasis a distancia. Las células del carcinoma primario pierden su adhesión célula-célula, mediada por la represión de cadherina-E, y se produce la disolución de la membrana basal y, posteriormente, se produce la intravasación para llegar al torrente circulatorio. Más tarde, estas células tumorales circulantes (CTCs) salen del torrente circulatorio para formar micrometástasis, y tiene lugar una transición mesenquimal-epitelial (MET) y un crecimiento clonal en los puntos metastásicos. Así pues, EMT y MET forman el inicio y desarrollo de la cascada de invasión-metástasis<sup>91</sup>.

#### 1.4.5. EMT y células madre

Las células que se transforman por el proceso de EMT son capaces de migrar y de reestablecer a distancia tumores con las mismas características que el tumor primario de donde derivan. Esto obliga a reconocer el concepto inverso de transición mesenquimal-epitelial<sup>92</sup>, y relaciona estrechamente este proceso al de las células madre precursoras de cáncer<sup>93</sup>. Evidentemente, el microambiente local intervendría en la regulación de este mecanismo<sup>94</sup>. Mani et al indujeron EMT en células humanas

de epitelio mamario no tumorigénicas, utilizando los factores de transcripción Twist o Snail. Las células adquirieron un fenotipo mesenquimal. Estudiaron las células mediante citometría de flujo, y mostraron un patrón de expresión de superficie celular similar al observado en células madre de cáncer de mama (CD44 alto/CD24 bajo). Además demostraron que las células habían adquirido propiedades de célula madre, con capacidad de autorrenovación y de producir múltiples estirpes celulares. Además, estas células CD44 alto/CD24 bajo expresaban un fenotipo mesenquimal y una regulación al alta de los factores de transcripción de la EMT, poniendo de manifiesto una relación directa entre la EMT y la adopción de propiedades de célula madre cancerosa<sup>80</sup>. De igual manera, ZEB1 es capaz de conferir propiedades de célula madre, fortaleciendo pues la relación entre EMT y progenitores tumorales. Esta propiedad, conferida por el fenómeno de EMT es doblemente peligrosa para el paciente, ya que no sólo capacita a las células para entrar en el torrente circulatorio, sino que también les confiere propiedades de células madre cancerosas con un potencial tumorigénico y proliferativo aumentado<sup>95</sup>.

#### 1.4.6. EMT, células madre y resistencia a drogas

La EMT también confiere resistencia a la senescencia prematura inducida por oncogenes. Twist1 and Twist2, así como ZEB1 protegen a las células humanas y a los fibroblastos de embriones de ratón de la senescencia. De forma similar, TGF $\beta$  puede promover la invasión tumoral y la evasión de la respuesta inmune en estadios avanzados. Cuando TGF $\beta$  actúa en células epiteliales mamarias activadas con expresión de Ras, se favorece la EMT y se inhibe la apoptosis<sup>96</sup>. Este efecto puede revertirse por inductores de la diferenciación epitelial, como GATA 3<sup>97</sup>. También se ha implicado la EMT como mecanismo de adquisición de resistencia a drogas. La ganancia de marcadores de EMT se asoció con la resistencia a paclitaxel en líneas celulares de carcinoma de ovario. De igual manera, SNAIL confiere resistencia a paclitaxel, adriamicina y a la radioterapia inhibiendo la apoptosis mediada por p53<sup>98</sup>. Además, la inflamación, que se había asociado a la progresión tumoral y a la fibrosis, se ha relacionado recientemente al cáncer mediante la activación de la EMT. Por tanto, la EMT, no sólo facilita un fenotipo migratorio a las células tumorales, sino que también



actúa en la inmunosupresión, resistencia a drogas, y evasión de la apoptosis generando una respuesta alterada del huésped al tumor.

Como se ha comentado previamente, evidencias recientes sugieren que las células que sufren una EMT obtienen propiedades de células madre, dando lugar a Cancer Stem Cells (CSCs), que demuestran resistencia a la quimioterapia y a la radioterapia<sup>99</sup>.

## 1.5. CÉLULAS MADRE

### 1.5.1. Introducción

La existencia de células madre precursoras del cáncer (CMC) en los melanomas es un tema controvertido.

En 1868 el término “stammzelle” o célula madre fue propuesto por Ernst Haeckel, un biólogo alemán, para referirse por un lado, a un organismo ancestral unicelular del cual supuso que todos los organismos multicelulares evolucionaron, y por otro, el huevo fertilizado del que derivan todas las células del organismo<sup>100</sup>. Tres décadas más tarde, el biólogo americano Edmund B Wilson acuñó el término para referirse a la célula madre indiferenciada de la línea germinal. Desde entonces se ha empleado para describir una variedad de conceptos. Actualmente, se reconocen por lo menos cuatro tipos de células madre: células madre embrionarias, células madre somáticas o adultas, células madre obtenidas por ingeniería genética, y células madre precursoras del cáncer (CMC).

De los cuatro tipos de células madre, las somáticas fueron las primeras en ser identificadas en los años 60<sup>101</sup>, y se consideran el prototipo de célula madre: se caracterizan por su capacidad de autorrenovación y de diferenciación en una progenie heterogénea, funcional y madura. Se describieron inicialmente en el tejido hematopoyético, y más tarde, se hallaron células con las mismas características en líneas mesodérmicas, ectodérmicas y endodérmicas. Por ejemplo, se encontraron células madre epidérmicas en el estrato basal epidérmico y en el bulbo piloso<sup>102</sup>, y progenitores de los melanocitos en la dermis<sup>103</sup> y folículos pilosos<sup>104</sup>. Se encargarían de asegurar la renovación y reparación de los tejidos.

Tres décadas después, se aislaron las células madre embrionarias, murinas<sup>105</sup> y humanas<sup>106</sup>. Se trata de células pluripotenciales del blastocisto, que dan lugar al organismo completo. Poseen también las propiedades de autorrenovación y proliferación, pero con mayor potencial de diferenciación que las células madre somáticas. El avance en su investigación se encuentra dificultado por los problemas éticos que derivan de la manipulación de embriones humanos. Por eso se desarrollaron células madre por ingeniería genética, o células pluripotentes inducidas (CPI), a partir de células somáticas.

### 1.5.2. Células madre cancerosas (CMC)

Se trata de células madre que se encuentran en una neoplasia, y que son responsables no solo de su formación, sino también de su progresión<sup>107</sup>. También poseen la capacidad de autorrenovación, produciendo nuevas células madre, y producen una población de células heterogéneas que maduran y por lo tanto sucumben a la apoptosis. La diferencia con las células madre somáticas, es que no responden a estímulos fisiológicos, sino que suponen el inicio de una formación neoplásica. Se ha postulado que estas CMC podrían derivar de las células madre somáticas sometidas a mutaciones<sup>108</sup>. Pero no todas las células somáticas que sufren mutaciones dan lugar a CMC, y no todas las CMC derivan necesariamente de células madre somáticas<sup>109</sup>. El mecanismo por el cual aparecen no está esclarecido<sup>107</sup>.

Se identificaron inicialmente en el tejido hematopoyético: se demostró que sólo algunos subgrupos de células tumorales en leucemia y mieloma múltiple eran capaces de proliferar<sup>110, 111</sup>, y se llamaron células madre leucémicas. En los años 90 se aislaron células madre leucémicas en estudios de leucemia aguda mieloide (LAM) y se encontró que tenían un fenotipo característico CD34+/CD38-<sup>112, 113</sup>. Esas células minoritarias eran capaces por sí solas de inducir el desarrollo de LAM, y de reproducir la heterogeneidad de las células tumorales una vez xenotransplantadas en ratones inmunodeficientes.

Más tarde, se identificaron las células madre cancerosas en numerosos cánceres: mama<sup>114</sup>, cerebro<sup>115</sup>, colon<sup>116</sup>, y melanoma cutáneo<sup>117</sup>.

Tras estos descubrimientos, la teoría de las células madre cancerosas ganó importancia frente al modelo tradicional de mutaciones acumuladas aleatorias y selección clonal, aunque ambos procesos no tienen por qué ser excluyentes<sup>107</sup>. En un intento de unificar criterios, la *American Asociación for Cancer Research (AACR)* en 2006, definió las células madre cancerosas como las células dentro de un tumor que poseen la capacidad de autorrenovación y de regenerar la heterogeneidad de células tumorales que conforman el tumor original<sup>110</sup>.

### 1.5.3. Células madre de melanoma (CMM)

La evidencia de la existencia de una subpoblación de células madre en el melanoma se describió en 2005 a partir de células aisladas de metástasis por melanoma en pacientes humanos y de líneas celulares establecidas<sup>118</sup>. Se destacó una subpoblación de células de melanoma capaces de crecer en forma de esferas no adherentes en medio de cultivo adecuado para las células madre embrionarias humanas (hESCs). Mostraban un fenotipo con expresión de CD20 en superficie (que normalmente se expresa en linfocitos B maduros). Se vio que eran capaces de generar nuevas células idénticas, y de diferenciarse en líneas melanocíticas, adipocíticas, osteocíticas y condrocíticas. Además, en xenotransplantes en ratones inmunodeprimidos (SCID) mostraron una mayor capacidad tumorigénica comparado con las células adherentes que no formaban esferas.

En 2006, se describió la existencia de células CD166 y CD133 positivas en los melanomas<sup>119</sup>. Se empleó el marcador CD133, descrito como marcador de célula madre en cáncer cerebral<sup>120</sup>, y de colon<sup>121</sup>, para aislar una subpoblación de células de melanoma de muestras biópsicas de pacientes<sup>122</sup>. Se demostró un mayor potencial tumorigénico tras xenotransplante en ratones NOD/SCID de la subpoblación CD133+ frente a la CD133-. De igual modo, en una línea celular establecida, se hallaron los mismos resultados. El marcador CD133 se coexpresaba con ABCG2, un miembro de la familia ABC (transportador de cassette de unión a ATP). También se estableció una correlación positiva entre la expresión inmunohistoquímica de CD133 y la progresión tumoral, en un estudio realizado en matrices tisulares<sup>119</sup>. Estos hallazgos se vieron

apoyados en otro estudio que mostró que la regulación a la baja de CD133 in vitro e in vivo resultaba en un crecimiento más lento y disminución de la capacidad metastásica. Más recientemente, se ha relacionado a las subpoblaciones CD133+ con una mayor tumorigenicidad a través de la “imitación vasculogénica”<sup>123</sup>. Las subpoblaciones de células CD133+ y ABCB5+ están colocalizadas en los melanomas en nichos perivasculares con células de melanoma CD144+ que forman canales pseudovasculares, fenómeno denominado imitación vasculogénica. Paralelamente, se realizaron estudios de fusión celular, y en 2003, buscando demostrar que ABCB5 podría tener un papel fundamental en la fusión de células progenitoras, se descubrió que ABCB5 marcaba los progenitores melanocíticos CD133+, además de determinar la propensión a la fusión<sup>124</sup>. Además, otros investigadores descubrieron la mediación de ABCB5 en los fenómenos de resistencia a tratamiento, identificándolo como transportador de drogas, y por lo tanto, como un marcador molecular de una subpoblación de células quimiorresistentes con fenotipo de célula madre<sup>125</sup>. Definitivamente, ABCB5 se estableció como biomarcador de célula madre de melanoma en un estudio publicado en 2008<sup>117</sup>. Se estudiaron xenotransplantes en ratones NOD/SCID de subpoblaciones de células de melanoma humano aisladas en función de la expresión de ABCB5. Se demostró que las células de melanoma ABCB5 + eran más tumorigénicas, y además capaces de autorrenovarse y de generar una población tumoral heterogénea, en contraste con las células ABCB5-, capaces de generar únicamente células ABCB5-. Además, para correlacionar la expresión de ABCB5 con la progresión tumoral, se estudió la expresión inmunohistoquímica de ABCB5 en matrices tisulares. Observaron una mayor expresión de ABCB5 en melanomas primarios comparado con los nevus, en melanomas primarios gruesos en comparación con los delgados, y en metástasis ganglionares comparado con melanomas primarios, concluyendo que ABCB5 podría ser un biomarcador de progresión tumoral. Otros estudios posteriores han apoyado este hallazgo<sup>126, 127</sup>. El primero describe una expresión de ABCB5 creciente en la progresión de nevus a melanoma, y el segundo, un aumento exponencial de expresión de ARN mensajero en melanomas más agresivos. Además, se ha descrito una disminución de la expresión de ABCB5 en las células de melanoma con inducción de la diferenciación terminal<sup>128</sup>. De estos estudios podría deducirse que la eliminación selectiva de la subpoblación de las

células ABCB5+ en un tumor primario podría inhibir el crecimiento tumoral. La administración sistémica de anticuerpos monoclonales anti-ABCB5 en ratones nude xenotransplantados retrasó el inicio y el crecimiento tumoral, y enlenteció la progresión de tumores establecidos, a través de una activación de la citotoxicidad mediada por células, dependiente de anticuerpos, contra las células de melanoma con el antígeno ABCB5<sup>104</sup>. Este estudio demostró pues sus posibles implicaciones terapéuticas.

El antígeno CD34 es una proteína codificada por un gen localizado en el cromosoma 1q que se expresa en la superficie de las células madre hematopoyéticas en la médula ósea. También se encuentra en tumores vasculares y de células fusiformes, así como en tumores de origen neural y con diferenciación fibrocítica, incluyendo el dermatofibrosarcoma protuberans, el tumor fibroso solitario y los fibromas pleomórficos<sup>129, 130, 131</sup>. Se han descrito algunos casos en la literatura de melanomas, primarios y metastásicos, con inmunofenotipo CD34 positivo, definido como aberrante<sup>132, 133</sup>, sin que se haya establecido claramente un valor pronóstico al respecto.

#### 1.5.4. Controversias con respecto a las CMM

Al describirse ABCB5 como marcador de célula madre, se presentaron resultados que sugerían que las células madre iniciadoras de melanoma no serían tan infrecuentes como se tenía pensado, y que las células tumorales diferentes de las células madre, podrían ser también tumorigénicas<sup>134</sup>. Demostraron que si inyectaban células de melanoma en Matrigel, en ratones nude NOD/SCID sin cadena gamma del receptor de la interleukina-2 (Il2rg-/-), una proporción de 1 de cada 9 células de melanoma era capaz de formar tumores, y que las células tumorigénicas no presentaban relación con la expresión de CD133, y eran fenotípicamente heterogéneas. Más tarde, el mismo equipo de investigación, utilizando métodos similares<sup>135</sup>, demostró que ninguno de los múltiples marcadores de superficie estudiados, incluido ABCB5 y CD271, permitía distinguir las células de melanoma tumorigénicas de las no tumorigénicas, y los marcadores de superficie parecían expresarse de manera reversible en las células

tumorigénicas. Además, apoyaban los resultados previos, describiendo hasta 28% de células tumorigénicas, todas ellas capaces de una proliferación ilimitada. Estos hallazgos cuestionan que el melanoma cutáneo siga el modelo clásico de tumorigénesis a partir de células precursoras del cáncer.

## 1.6. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

Establecer y comprender las bases moleculares que confieren a las células tumorales la capacidad de diseminación neoplásica es esencial para poder predecir el potencial comportamiento metastásico de los tumores humanos, en este caso del melanoma, ofreciendo la posibilidad de actuaciones terapéuticas precoces que prevengan la extensión de la enfermedad, dados los resultados poco esperanzadores que ofrece el tratamiento en fases avanzadas. En este sentido, se ha implicado a la expresión de marcadores de células madre y de transición epitelio-mesénquimal en la progresión tumoral.

### 1.6.1. Hipótesis

-Los factores de transición epitelio-mesénquimal estarían implicados en la progresión tumoral del melanoma cutáneo, y podrían constituir marcadores evolutivos o factores predictivos de la misma.

-Las células madre cancerosas estarían implicadas en la progresión tumoral del melanoma, y su estudio podría constituir un marcador evolutivo de la enfermedad o aportar un valor pronóstico a la misma.

### 1.6.2. Objetivos

#### Parte clínica:

-Estudiar la asociación de los marcadores de transición epitelio-mesenquimal (Cadherina-N, osteonectina/SPARC, Osteopontina, fibronectina, Twist, Snail) y de marcadores de célula madre cancerosa (ABC-B1, ABC-G2, CD133, ABC-B5) con marcadores pronósticos clásicos (índice de Breslow, índice mitótico, ulceración).

-Estudiar la asociación de los marcadores de transición epitelio-mesenquimal (Cadherina-N, osteonectina/SPARC, Osteopontina, fibronectina, Twist, Snail) y de marcadores de célula madre cancerosa (ABC-B1, ABC-G2, CD133, ABC-B5) con la progresión tumoral

-Estudiar la asociación de los marcadores de transición epitelio-mesenquimal (Cadherina-N, osteonectina/SPARC, Osteopontina, fibronectina, Twist, Snail) y de marcadores de célula madre cancerosa (ABC-B1, ABC-G2, CD133, ABC-B5) con el desarrollo de metástasis a distancia.

-Estudiar la asociación de los marcadores de transición epitelio-mesenquimal (Cadherina-N, osteonectina/SPARC, osteopontina, fibronectina, twist, snail) y de marcadores de célula madre (ABC-B1, ABC-G2, CD133, ABC-B5) con el tiempo libre de enfermedad y con la supervivencia.

-Estudiar la correlación entre los hallazgos de expresión por RT-PCR y la expresión proteica por inmunohistoquímica para los diferentes marcadores de transición epitelio-mesenquimal (cadherina-N, osteonectina/SPARC, osteopontina, fibronectina, twist, snail) y de marcadores de célula madre cancerosa (ABC-B1, ABC-G2, CD133, ABC-B5)

-Realizar un análisis estadístico de todas las variables para intentar definir nuevos factores pronósticos en los melanomas cutáneos primarios.

#### Parte experimental:

-Estudiar los perfiles de expresión de factores de transición epitelio-mesenquimal (cadherina-N, osteonectina/SPARC, osteopontina, fibronectina, Twist, Snail) y de marcadores de célula madre cancerosa (ABC-B1, ABC-G2, CD133, ABC-B5) en diferentes líneas celulares de melanoma.

-Seleccionar subpoblaciones celulares de melanoma humano con presencia o ausencia de marcadores de célula madre cancerosas a partir de líneas celulares de melanoma y suspensiones celulares obtenidas a partir de muestras humanas.

-Estudiar las diferencias de tumorigenicidad, en ratones inmunodeficientes, mediante inyecciones subcutáneas e intravenosas de células de melanoma humano seleccionadas a partir de líneas celulares con presencia o ausencia de marcadores de células madre con el objeto de comprobar si existen diferencias.

-El estudio de las posibles modificaciones de la expresión de marcadores de célula madre cancerosa y de marcadores de transición epitelio-mesénquimal en los tumores obtenidos por xenotransplante mediante inoculación en ratones inmunodeficientes.



## 2. Metodología



## 2. METODOLOGÍA

Este trabajo de tesis consta de un estudio descriptivo, retrospectivo y prospectivo, en el que se han revisado diversas características clínicas, histopatológicas, inmunohistoquímicas y moleculares, en una serie de muestras humanas de melanoma en diferentes estadios evolutivos, y de una parte experimental con líneas celulares y tumores xenotransplantados en ratones nude nu/nu.

### 2.1. Estudio clínico-patológico

#### A-Pacientes

##### A-1. Selección de muestras

Se seleccionaron una serie de pacientes con diagnóstico de melanoma cutáneo localizado (estadios I y II), con extensión loco-regional (estadio III), o metástasis a distancia (estadio IV), intervenidos en el Hospital Clínico Universitario de Valencia y cuyas muestras tumorales habían sido recibidas en el Servicio de Anatomía Patológica durante los años 2002-2013. Fue requisito indispensable en todos los casos el consentimiento informado del paciente para su inclusión en el estudio.

Se incluyeron un total de 132 muestras tumorales, de las cuales: 70 melanomas primarios y 62 metástasis de melanoma: 18 en tránsito, 27 en ganglios linfáticos regionales, y 17 metástasis a distancia (pulmonares, cerebral, hepática, pleural, ósea, cutáneas). Los melanomas primarios fueron subdivididos, de acuerdo con el actual sistema de estadiaje del AJCC, en delgados ( $\leq 1\text{mm}$ ) ( $n=31$ ) y gruesos ( $>1\text{mm}$ ) ( $n=39$ ) (Tablas 1).

Tabla 1. Muestras estudiadas en este trabajo

Muestras (n=144)	Nº de casos
Melanomas primarios	70
Delgados	31
Gruesos	39
Metástasis en tránsito	18
Metástasis ganglionares	27
Metástasis a distancia	17
Pulmonar	4
Cutánea a distancia	4
Pleural	3
Subcutánea	3
Cerebral	2
Hepática	1
Ósea	1

Se realizaron sobre las muestras tumorales (2 secciones adyacentes de 1-2 mm de espesor), congeladas en isopentano enfriado en nitrógeno líquido, y almacenadas a –70°C hasta el momento de su utilización. Una muestra de cada tumor se utilizó para extracción de ARN (técnica de TRIzol), la obtención de ADNc por RT-PCR, y la posterior cuantificación de los niveles de expresión por PCR cuantitativa (en tiempo real).

El resto del material se incluyó en formaldeído al 10% que se procesó en alcoholes a concentraciones crecientes y xiloles para su inclusión en bloques de parafina. Se realizaron secciones de 3 micrómetros, y se fijaron en un portaobjetos con Poly-L-Lysina. Se realizó una tinción con hematoxilina-eosina, de acuerdo al protocolo estándar adjunto.

#### **Tinción con hematoxilina-eosina:**

- 1-Se incubaron las muestras a 60°C antes de desparafinar, 20 minutos.
- 2-Se desparafinaron las muestras en xilol durante 5 minutos.
- 3-Se hidrataron las muestras con pases por etanol a concentraciones decrecientes.
- 4-Se realizó la tinción nuclear con hematoxilina durante 5 minutos.
- 5-se enjuagó con agua destilada durante 2 minutos
- 6-Se sumergieron las muestras en ácido clorhídrico al 0,5% para decolorar (1 pase rápido).

7-Se lavaron con agua corriente, posteriormente con hidróxido de amonio, y nuevamente un lavado con agua corriente..

8-Para la tinción citoplasmática se sumergieron las muertas en eosina durante 4 minutos, y se lavaron con agua corriente.

9-Se deshidrataron las muestras con pases de etanol a concentraciones crecientes.

10-Se aclararon con xilol durante 1 minuto.

11-Finalmente se montaron con Entellan® (medio de inclusión para microscopía de Merck) y un cubreobjetos.

## A-2. Variables estudiadas

Se realizó un seguimiento clínico de todos los pacientes con melanoma primario, hasta julio de 2014, con un seguimiento mínimo de 278 días, y se registró la aparición de metástasis, en tránsito, ganglionares y a distancia, así como el momento de su aparición y la localización. Del mismo modo, se registraron las fechas de deceso y su causa, excluyendo del estudio de evolución clínica dos pacientes cuyo seguimiento no pudo realizarse. Además se recogieron una serie de parámetros clínicos e histológicos el momento del diagnóstico:

Las variables clínicas estudiadas fueron :

- sexo (femenino o masculino)
- edad del paciente: expresada en años en el momento del diagnóstico
- localización de la lesión (0=extremidades, 1=tronco, 2=cabeza y cuello)

- las variables histológicas estudiadas fueron:

- tipo histológico (melanoma de extensión superficial=1, melanoma sobre lentigo maligno=2, melanoma lentiginoso acral=3, melanoma nodular=4)
- invasión (no=0, sí=1)
- ulceración (no=0, sí=1)
- mitosis
- fase (radial=0, vertical =1)
- índice de Breslow

- nivel de Clark
- TNM
- estadio
- asociación con otra lesión melánica (no=0, sí=1)
- infiltrado inflamatorio (ausente=0, discontinuo=1, continuo=2)
- invasión linfovascular (ausente=0, presente=1)

## B.-Construcción de matrices tisulares (TMA)

**Recogida de bloques y preparaciones:** Se escogieron los bloques más representativos de cada lesión incluida en el estudio.

**Selección del área a incluir en la matriz:** Tras revisar las laminillas teñidas con métodos convencionales (hematoxilina-eosina) correspondientes a los bloques seleccionados, se marcaron con un rotulador indeleble las 3 áreas más representativas de cada muestra. A continuación se enfrentó cada portaobjetos a su bloque correspondiente, con el fin de marcar el área señalada en el mismo.

**Diseño de la matriz:** Se diseñaron 9 matrices tisulares de filas y columnas, constituidas por entre 5 y 8 filas, y entre 6 y 10 columnas. Cada matriz contenía entre 21 y 46 cilindros tumorales, y 3 controles externos de piel y órganos sanos. Se confeccionaron 9 plantillas cuadrículadas para identificar la posición exacta de cada muestra, dispuesta en la matriz en el mismo orden.

**Construcción de la matriz:** Para confeccionar los bloques con las TMA se empleó el aparato MTA-1 (Manual Tissue Arrayer, Beecher Instruments, Inc., Sun Prairie, WI, USA). Este dispositivo consiste en un sistema manual de extracción y posterior inserción de cilindros de tejido parafinados, que permite agrupar numerosas muestras en un único bloque, y así optimizar los recursos y estandarizar las condiciones al aplicar las tinciones inmunohistoquímicas.

Los bloques con las TMA se construyeron de la siguiente manera (Fig.3):

- En primer lugar, se desvastó ligeramente la parafina con el microtomo, con la finalidad de que todos los cilindros tuvieran el mismo ángulo. Posteriormente

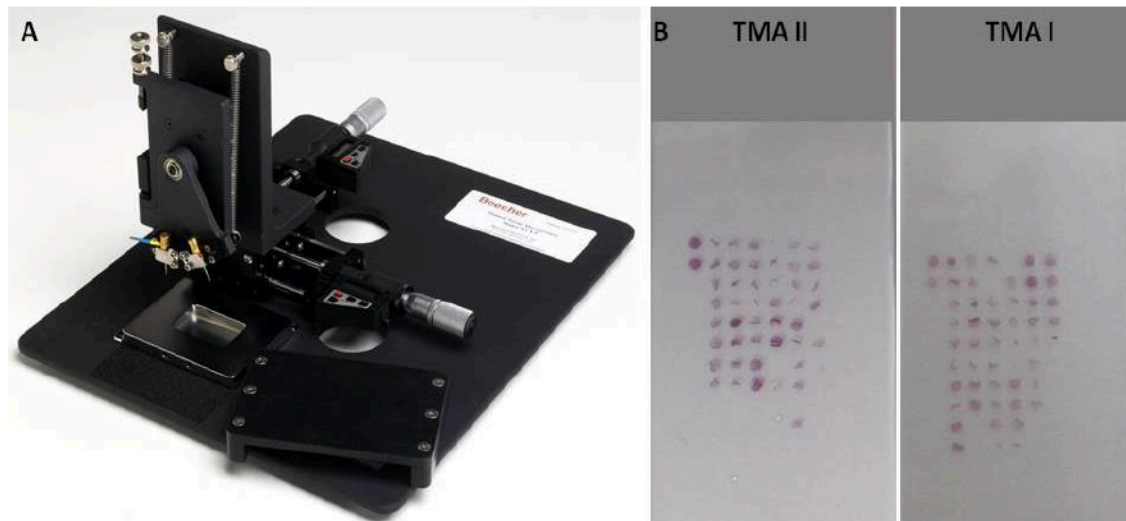
se colocó y se fijó el bloque receptor en la base del instrumento, y se situó el tejido que sirve como testigo de acuerdo a la ubicación de la plantilla.

- Para confeccionar los bloques se usaron agujas de 1mm de diámetro, una para crear una matriz regular de agujeros en el bloque de parafina receptor, y otras para extraer los fragmentos tisulares de las áreas previamente seleccionadas en los bloques de tejido donantes. Se situó a la izquierda la que extrae el cilindro del tejido del bloque donante, y a la derecha la que realiza el agujero en el bloque receptor.
- Se ajustaron a cero los micrómetros que marcan la alineación de las filas y columnas de los cilindros.
- Se realizó el agujero en el bloque receptor, rotando el émbolo de la aguja para profundizar unos 3 mm.
- Se colocó el bloque con el tejido donante sobre el puente del aparato, se cambió la guja, y se extrajo el tejido tumoral marcado previamente.
- Se retiró el puente con el bloque donante y se colocó el cilindro de tejido sobre el agujero hecho en la parafina del bloque receptor, pero sin hundirlo.
- Se colocó encima un portaobjetos para alisar la superficie del cilindro y nivelarla con la parafina.
- Se cambió la medida del micrómetro a la posición siguiente para realizar el agujero con la respectiva aguja, realizándose desplazamientos laterales de 2 mm cada vez.
- Se repitió el mismo proceso de forma sucesiva hasta completar todos los casos.
- Como ya se ha mencionado, de cada caso se tomaron 3 cilindros de muestra, de las áreas más representativas del tumor.

**Conservación de la matriz:** Una vez construidas estas TMA, se introdujeron en una estufa a 37°C durante 12 horas para llevar a cabo la homogeneización y consolidación de las mismas, al mezclarse la parafina de los cilindros de tejido tumoral con la parafina del bloque receptor.

Posteriormente, se realizaron un mínimo de 12 secciones de 2 micras de grosor de cada matriz tisular, que se fijaron en un portaobjetos con polilisina de Dako (ref. K.820), y se procesaron para los diferentes estudios inmunohistoquímicos. Se almacenaron todas las muestras protegidas con una capa de parafina líquida.

**Figura 3. A. Imagen del aparato MTA-1, empleado para la confección de las matrices tisulares. B. Ejemplo de laminillas con cortes de los TMA obtenidos**



### C.-Protocolos empleados en la técnicas de inmunotinción

Se realizó el estudio inmunohistoquímico de las matrices tisulares con 9 anticuerpos (cadherina N, osteonectina/SPARC, osteopontina/Spp, fibronectina, snail, twist, CD34, CD133, ABCB5). La técnica de inmuntinción se realizó siguiendo el protocolo detallado a continuación:

#### C-1-DESPARAFINADO:

- Se calentaron las preparaciones (matrices tisulares) a 65°C durante 30 minutos.
- se incubaron en un primer xiloldurante 15 minutos y después se realizaron pases rápidos por xilol limpio.

#### C-2.-REHIDRATACIÓN:

- Se lavaron con alcohol absoluto.
- Se lavaron con alcohol al 70%.
- Se lavaron con alcohol al 50%.
- Se lavaron con abundante agua y agua destilada.



**C-3- DESENMASCARAMIENTO ANTIGÉNICO**

-No se realizó este paso para la fibronectina y CD133.

-Los anticuerpos OP, Snail, Twist, ON, cadherina-N y ABCB5 se incubaron en tampón comercial de Dako con pH bajo, durante 3 minutos, a 1, 5 atmósferas de presión en autoclave, a 128°C.

- (*EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution Low pH (50x)*) (K8005)

-El anticuerpo CD34 se incubó en tampón comercial de Dako con pH alto, durante 3 minutos, a 1, 5 atmósferas de presión en autoclave, a 128°C.

- (*EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution Hight pH (50x)*) (DM828)

**C-4.-BLOQUEO DE LA PEROXIDASA ENDÓGENA:**

-Una vez realizada la descompresión del autoclave, se dejaron enfriar las preparaciones en los respectivos tampones y después se lavaron con agua, agua destilada, y por último con TBS comercializado por Dako.

- (*En Vision™ Flex Wash Buffer (20x)*) (DM831); solución salina tamponada con Tris que contiene *Tween* 20, concentrada 20 veces, pH 7, 6 ( $\pm 0,1$ ). Se realizó una dilución 1:20 con agua destilada).

-Se incubaron las preparaciones con solución de bloqueo de la peroxidasa comercializada por Dako durante 10 minutos. Se trata de una solución tamponada que contienen peróxido de hidrógeno y conservante (Ref. S2023)

**C-5.-ANTICUERPO PRIMARIO:**

-Se lavaron 3 veces con PBS.

-Se diluyeron los anticuerpos puros en diluyente de anticuerpo comercializado por Dako.

- (*En Vision™ FLEX Antibody Diluent* (Ref. K8006); tampón de Tris, pH 7,2, que contienen 15 mmol/L de Na<sub>3</sub>B y proteína.

-Las concentraciones para cada uno de los anticuerpos se especifican en la tabla 2)

-Se incubó una hora a temperatura ambiente.

-El anticuerpo CD133 se incubó durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C.

#### **C-6.-SISTEMA DE VISUALIZACIÓN:**

-Se lavaron 3 veces con TBS.

-Incubación de los anticuerpos:

- En el caso de los anticuerpos Snail y Twist, y CD34 se realizó una incubación con *EnVision* durante 30 minutos y se visualizó con DAB+ (CHROM), incluido en el KIT, que produce un color marrón en el lugar del sustrato diana.

- *Dako REAL™ EnVision™ /HRP, Rabbit/Mouse (ENV)*, REF. K5007; se trata de dextrano unido a moléculas de peroxidas y moléculas de anticuerpo secundario de cabra frente a inmunoglobulinas de conejo y ratón en solución tamponada, que contienen proteína estabilizante y conservante. Este reactivo es un polímero conjugado con peroxidasa, que también está recubierto de anticuerpos frente a las inmunoglobulinas de conejo y de ratón. Se compone de un esqueleto de dextrano al que se han unido gran número de moléculas de peroxidasa (HRP) y moléculas de anticuerpo secundario. Para la reacción de unión se ha utilizado una química única que permite la unión de hasta 100 moléculas de HRP y hasta 20 moléculas de anticuerpo por esqueleto.

El anticuerpo secundario unido al esqueleto de dextrano se ha obtenido de cabras, y reacciona igualmente bien con inmunoglobulinas de conejo y ratón; por tanto, sólo se necesita un reactivo de detección para los anticuerpos primarios de conejo y ratón.

- Para los anticuerpos fibronectina, osteopontina/Spp, osteonectina/SPARC, cadherina-N, ABCB5, y CD133 se utilizó

también EnVision, pero con el cromógeno (Permanent Red) que tiñe de color rojo el sustrato diana.

- Dako EnVision G/2 System /AP, Rabbitt/Mouse, Permanent Red, Ref. K5355.

-Se paró la reacción lavando con agua destilada.

#### **C-7.-TINCIÓN DE CONTRASTE:**

-Se contrastó con tinción de hematoxilina-eosina.

-Se lavaron las preparaciones con agua destilada.

#### **C-8.-DESHIDRATACIÓN:**

-Se procedió a la deshidratación de las muestras con pases en alcoholes de gradación creciente hasta etanol absoluto.

#### **C-9.-ACLARADO:**

Se realizaron varios pases por Xilol.

#### **C-10.-MONTAJE**

Se cubrieron las preparaciones con Entellan® y un cubreobjetos.

**Tabla 2. Anticuerpos utilizados**

ANTICUERPO	CLON	CASA COMERCIAL	REFERENCIA	DILUCION	RA
FIBRONECTINA	IST9	ABCAM	ab6328	1/500	NO
OSEOPONTINA	Policlonal	ABCAM	ab8448	1/300	SI
SNAIL	N-term D24	ABGENT	AP2054a	1/25	SI
TWIST	2C1A	ABCAM	Ab50887	1/50	SI
OSTEONECTINA	15G12	LEICA	35877	1/80	SI
CADHERINA-N	6G11	DAKO	M3613	1/50	SI
ABCB5	Policlonal	SIGMA-ALDRICH	HPA026975	1/100	SI
CD133	AC133	MACS	130-090-422	1/50	NO
CD34	QBend10	DAKO	IR-632	Prediluido	SI
RA: recuperación antigénica					

#### D-Evaluación de la inmunoreactividad:

La positividad de la inmunotinción se valoró en función de la intensidad de la tinción, definiendo 4 grados como ausente=0, leve=1, moderada=2 e intensa=3 y se calculó el porcentaje de celularidad positiva respecto a la tumoral total presente la muestra, indicando el patrón de tinción: nuclear, citoplasmático, o de membrana.

Todas las matrices fueron evaluadas sin conocimiento de los datos clinicopatológicos. La valoración de la inmunotinción se llevó a cabo en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, utilizando un microscopio Olympus multicabecal, por dos patólogos experimentados. De cada muestra se estudiaron 3 cilindros tumorales, y los datos obtenidos se pasaron a una base de datos.

#### E-Marcadores inmunohistoquímicos empleados

##### 1.-Cadherina-E:

Las cadherinas son glicoproteínas transmembrana mediadoras de la adhesión célula-célula de forma homotípica (unión entre células con fenotipos similares) y dependiente del calcio. La familia de las cadherinas incluye más de 20 tipos diferentes de las que las más clásicas son la cadherina-E (epitelial), la Cadherina-N (neural), la P-cadherina (placentaria) y la L-cadherina (hepática). La cadherina-E y la Cadherina-N participan en las uniones intercelulares de tipo adherente. Su función está, en parte, regulada por el terminal -COOH del dominio intracelular mediante cateninas de tipo alfa, beta y gamma, que interactúan con elementos del citoesqueleto de las células. La integridad de este componente intracitoplásmico es esencial para una correcta adhesión celular. A diferencia de lo que ocurre con otras moléculas de adhesión (lectinas por ejemplo), las cadherinas establecen uniones celulares estables en el tiempo, jugando así un papel importante en la morfogénesis y mantenimiento de la estructura tisular tanto en la embriogénesis como en la vida adulta.

La inmunotinción se valoró como negativa (ausencia total de tinción =0); débil (tinción débil pero reconocible =1); moderada (tinción heterogénea de color rojo claro=2) e intensa (tinción homogénea color rojo oscuro =3)

**2.-Fibronectina:**

Es una glicoproteína dimérica presente en la matriz extracelular (MEC) de la mayoría de los tejidos celulares animales compuesta por dos subunidades muy largas unidas por puentes disulfuro situados cerca del extremo carboxilo. Existe la fibronectina plasmática, que es soluble. El resto de fibronectinas se depositan en la matriz extracelular como fibrillas muy insolubles, y en la superficie de determinadas células, como los fibroblastos y se establecen interacciones entre las fibrillas extracelulares de fibronectina y los filamentos intracelulares de actina, que están mediadas en su mayor parte por integrinas. Así es como el citoesqueleto contráctil de actina y miosina tira de la matriz de fibronectina generando fuerzas de tracción.

La inmunotinción se valoró como negativa (ausencia total de tinción =0); débil (tinción débil pero reconocible =1); moderada (tinción heterogénea de color rojo claro=2) e intensa (tinción homogénea color rojo oscuro =3)

**3.-Osteonectina/SPARC:**

La osteonectina (ON), también llamada BM-40 o SPARC (proteína segregada, ácida y rica en cisteína) es una glicoproteína multifuncional de 32,5 kD que participa en la mineralización de los tejidos, así como en la modelización de la matriz extracelular.

La inmunotinción se valoró como negativa (ausencia total de tinción =0); débil (tinción débil pero reconocible =1); moderada (tinción heterogénea de color rojo claro=2) e intensa (tinción homogénea color rojo oscuro =3). Además se valoró la existencia de un gradiente en la inmunotinción (0=ausencia de gradiente, 1= gradiente decreciente en periferia y 2= gradiente creciente en periferia)

**4.-Osteopontina:**

La osteopontina es una proteína de matriz extracelular de 34 kD con un dominio de unión celular. Otras moléculas que comparten este dominio son la fibronectina, la vitronectina y una variedad de proteínas extracelulares que se unen a los miembros de la familia de las integrinas (de los receptores de la superficie celular). La osteopontina se identificó originalmente como un componente principal de la matriz ósea orgánica no colagenosa, sin embargo, se ha demostrado su presencia posteriormente en una amplia variedad de tejidos adultos normales y líquidos corporales. Es una proteína

multifuncional que participa en la mineralización ósea, la adherencia celular, la migración celular, la enfermedad inflamatoria crónica y la transformación.

La inmunotinción se valoró como negativa (ausencia total de tinción =0); débil (tinción débil pero reconocible =1); moderada (tinción heterogénea de color rojo claro=2) e intensa (tinción homogénea color rojo oscuro =3)

#### **5.-Snail:**

La familia Snail es una familia de factores de transcripción que tiene entre cuatro y seis dedos de zinc en el extremo carboxilo terminal.

Los dedos de zinc se unen a la caja E2 o al elemento E-PAL del promotor de la Cadherina E, inhibiendo su transcripción.

La inmunotinción se valoró como positiva (=1) cuando había tinción nuclear, y negativa (=0) cuando no la había. Se indicó paralelamente la existencia (=1) o ausencia (=0) de tinción citoplasmática.

#### **6.-Twist:**

Twist es un factor de transcripción hélice-vuelta-hélice básico que regula la morfogénesis embrionaria. Conduce a la pérdida de contactos célula-célula y a la dispersión celular. Favorece la pérdida de marcadores epiteliales y la ganancia de marcadores mesenquimales.

La inmunotinción se valoró como positiva (=1) cuando había tinción nuclear, y negativa (=0) cuando no la había. Se indicó paralelamente la existencia (=1) o ausencia (=0) de tinción citoplasmática

#### **7.-CD133:**

CD133 o Prominina 1, es una glicoproteína transmembrana, codificada en humanos por el gen PROM1. No se sabe exactamente su función, aunque se relaciona con la organización topográfica de la membrana citoplasmática. Se expresa en las células madre hematopoyéticas, células progenitoras endoteliales y en células madre de muchos tejidos, así como en células tumorales.

La inmunotinción se valoró como negativa (ausencia total de tinción =0); débil (tinción débil pero reconocible =1); moderada (tinción heterogénea de color rojo claro=2) e intensa (tinción homogénea color rojo oscuro =3)

#### **8.-CD34:**

La proteína CD34 se expresa selectivamente en las células progenitoras hematopoyéticas mieloides y linfoides. El antígeno CD34 se expresa también en el endotelio vascular, y constituye una importante molécula de adhesión necesaria para que los linfocitos T entren en los ganglios linfáticos.

Se valoró la presencia (=1) o ausencia (=0): de tinción nuclear, de tinción del estroma intratumoral, y de tinción del estroma extracelular. Asimismo, se realizó una estimación cuantitativa del porcentaje de células tumorales con tinción citoplasmática (independientemente de su intensidad). Se realizó también un conteo del número de estructuras endoteliales positivas en un campo de gran aumento (40x).

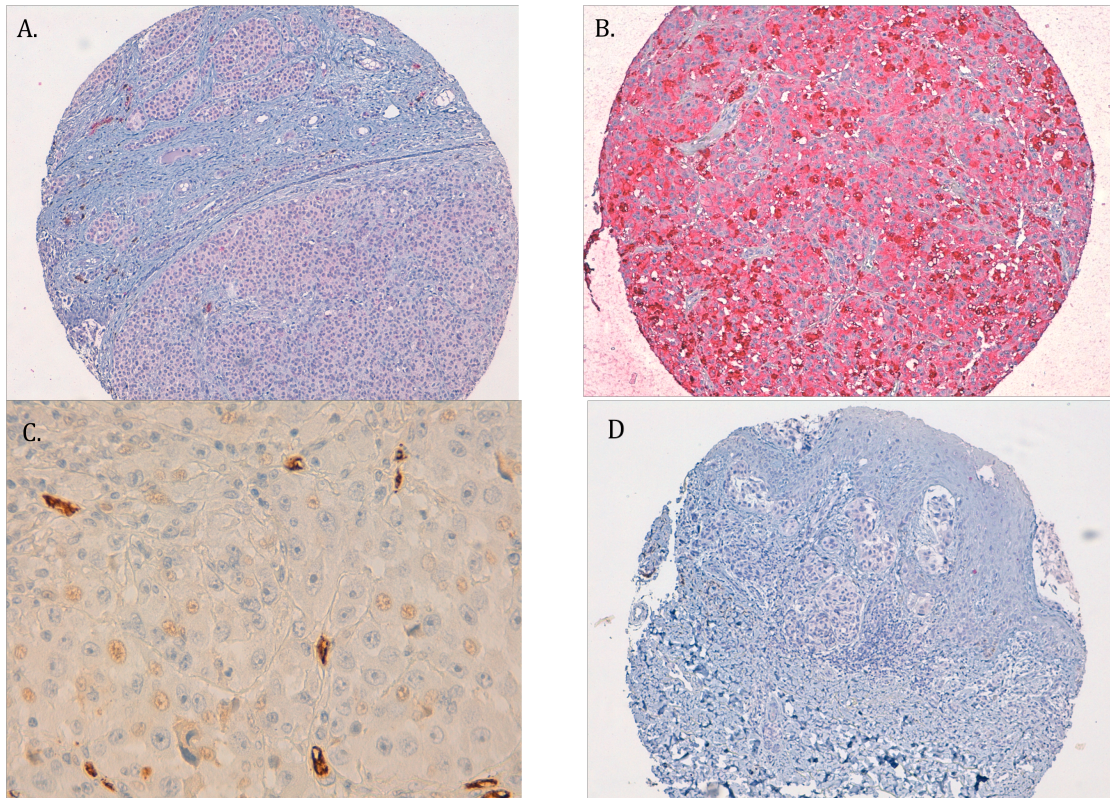
#### **9.-ABCB5:**

**El ABCB5 (transportador de cassette de unión a ATP, familia B, miembro 5 o glicoproteína-P ABCB5)** es una proteína plasmática transmembrana que en humanos está codificada por el gen ABCB5. ABCB5 es un transportador ABC y miembro de la familia de las glicoproteínas P, que se expresa fundamentalmente de forma fisiológica en la piel, y se ha descrito en melanoma cutáneo.

La inmunotinción, citoplasmática, se valoró como negativa (ausencia total de tinción =0); débil (tinción débil pero reconocible =1); moderada (tinción heterogénea de color rojo claro=2) e intensa (tinción homogénea color rojo oscuro =3)



**Figura 4. Ejemplo de inmunotinciones obtenidas**



- A: Tinción con OP: débil (intensidad 1), y citoplasmática  
 B: Tinción con cadherina-N: intensa (intensidad 2) y citoplasmática  
 C: Tinción con CD34: nuclear  
 D: Tinción con CD133: negativa

#### **F.-Biología molecular: Estudio de expresión génica**

De las muestras incluidas en este trabajo, se pudo llevar a cabo el estudio molecular en un total de 131 tumores, ya que en los restantes se obtuvieron amplificaciones fuera de rango.

Se estudiaron los siguientes genes:

- Genes marcadores de CMC: ABCB5, ABCB1, ABCG2 y CD34, (prot de superficie)
- Genes marcadores de EMT: cadherina-E (CDH1), cadherina-N (CDH2), FN1, ON/SPARC, OP (SPP1), SNAI1, SNAI2, y TWIST.



### **F.1.PROTOCOLO EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL (A PARTIR DE MUESTRAS TUMORALES HUMANAS CONGELADAS)**

La extracción del ARN total de los tumores de los pacientes se realizó usando el reactivo TRIzol (Invitrogen) seguido del empleo del PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Se usó 1mL de TRIzol Reagent por 50 mg de tejido. El protocolo utilizado se expone a continuación.

#### Lisis y homogenización

1. Inmediatamente después de sacar la muestra tumoral del congelador ésta se disgrega manualmente con la ayuda de un bisturí. Añadir 1ml de trizol antes de evidenciar cualquier signo de descongelación de la muestra.
2. Incubar 5 min el lisado a T<sup>a</sup> ambiente.
3. Añadir 200 µl cloroformo y mezclar bien con la pipeta y/o por inversión 15 sec.
4. Incubar durante 15 min a T<sup>a</sup> ambiente.
5. Centrifugar durante 15 min a 12000g a 4°C.
6. Transferir la fase acuosa (la superior), aproximadamente 600 µl, a un tubo limpio. No apurar.
7. Añadir un volumen de etanol 70% frío y mezclar bien con la pipeta. Dispersar cualquier precipitado visible tras añadir el etanol.

#### Unión a la membrana de la columna

8. Transferir 700 µl de la muestra a una de las columnas suministradas en el kit.
9. Centrifugar 15 sec a 13.400rpm a T<sup>a</sup> ambiente. Descartar el eluido.
10. Repetir los pasos 8 y 9 hasta que haya pasado todo el volumen de la muestra.

#### Lavado

11. Añadir 700 µl de Wash Buffer I a la columna.
12. Centrifugar 15 sec a 13.400 rpm a T<sup>a</sup> ambiente.
13. Tirar el tubo con el líquido y poner uno nuevo de lavado (viene en el kit).

14. Añadir 500µl de Wash Buffer II a la columna.
15. Centrifugar 15 sec a 13.400 rpm a Tª ambiente. Descartar el líquido que ha sido eluido.
16. Repetir pasos 14 y 15.
17. Centrifugar la columna vacía durante 1 minuto a 13.400 rpm a Tª ambiente para eliminar el tampón remanente.

#### Elución del RNA

18. Poner la columna en un RNA Recovery Tube (suministrado en el kit).
19. Añadir 30µl de H<sub>2</sub>O libre de RNasas e incubar 10 min a Tª ambiente.
20. Centrifugar la columna 3 min a máxima velocidad (13.400 rpm).
21. Repetir los pasos 19 y 20, de forma que V<sub>f</sub>=60µl.

En el ARN total así extraído se encuentran representados los ARNs mensajeros (ARNm) de los genes sujetos a expresión en el momento de la congelación de la muestra.

## **F.2. CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ARN MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA**

A continuación, se determina la concentración del ARN recién extraído mediante espectrofotometría, usando el NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific), midiendo la absorción de luz UV con una longitud de onda de 260 nm. Para la cuantificación se emplearon 1,5µl de ARN.

El blanco se realizó utilizando el agua de elución empleada en el último paso de la extracción de ARN. A continuación se aplican 1,5µl de ARN de la muestra y la medición se realiza de forma automática.

El cálculo de los ratios entre las absorbancias dadas por cada muestra a 230, 260 y 280nm se realizan automáticamente junto a la determinación de la concentración, lo

que nos da una idea de la calidad y la pureza de las muestras de forma individualizada. Los ratios 260/280 y 260/230 proporcionan información sobre la posible presencia de proteínas y sales, respectivamente, en la muestra. Valores de 1,8 o superiores indican que la muestra no está contaminada por proteínas y por sales.

El ARN así obtenido y cuantificado se conserva a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la transcripción reversa.

### **F.3. ESTUDIO EXPRESIÓN GÉNICA**

La cuantificación de la expresión génica se llevó a cabo en dos pasos:

1. Retrotranscripción reversa o RT ( paso de ARN total a ADNc)
2. Amplificación por PCR a tiempo real o PCR cuantitativa

En el primero de los pasos, la estrategia de síntesis del ADN complementario está basada en hexámeros al azar, que servirán de cebadores para la síntesis del ADNc por parte de la transcriptasa reversa. Posteriormente seleccionaremos el ADNc proveniente de nuestro transcrito diana llevando a cabo la PCR cuantitativa con sondas de hidrólisis o sondas Taqman específicas de los genes objeto de estudio.

#### Transcripción inversa o retrotranscripción (RT)

La transcripción reversa consiste en la síntesis de moléculas de ADN complementarias (ADNc) al ARN total extraído con anterioridad. El volumen final de reacción empleado fue de 100 $\mu\text{l}$  para que hubiese ADNc suficiente para el estudio de todos los genes objeto de estudio. El kit utilizado fue el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit , de Applied Biosystems. El procedimiento, tras la descongelación de las muestras y de los componente en hielo, se detalla a continuación.

1. Preparar la mezcla de reacción de la RT 2X en hielo según la tabla 3. Se prepararán 50 $\mu\text{l}$  de dicha mezcla por reacción que vayamos a realizar.

2. Mezclar bien (sin vortear) y centrifugar brevemente para que bajen todos los componentes de las paredes del tubo. Mantener en hielo.
3. Añadir el ARN total a cada una de las mezclas de reacción (2X) para obtener una mezcla 1X. La cantidad de ARN total a añadir serán los  $\mu\text{l}$  necesarios según la concentración de cada muestra, para tener 300ng totales. Este volumen de ARN se completa con agua libre de nucleasas hasta 50 $\mu\text{l}$  para tener un volumen final de 100 $\mu\text{l}$ .
4. Llevar a cabo el ciclo térmico en un termociclador según tabla 4.
5. Emplear las reacciones de RT (ADNc) directamente para la PCR cuantitativa o guardarlas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Tabla 3: Composición de la mezcla de reacción de la RT.**

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{l}</math>) por reacción</b>	<b>Concentración final</b>
<b>10X RT Buffer</b>	10	1X
<b>10X RT random primers</b>	10	1X
<b>25X dNTP Mix (100 mM)</b>	4	1X
<b>Multiscribe™ Reverse Transcriptase (50U/<math>\mu\text{l}</math>)</b>	5	2,5U/ $\mu\text{l}$
<b>Inhibidor de RNasas (20U/<math>\mu\text{l}</math>)</b>	5	1U/ $\mu\text{l}$
<b>Agua libre de nucleasas</b>	16	
<b>ARN (300ng) + agua libre de nucleasas</b>	50	3ng/ $\mu\text{l}$ ARN
<b>Volumen final reacción</b>	100	

Tabla 4. Condiciones del ciclo térmico de la RT.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
<b>Temperatura</b>	25°C	37°C	85°C	4°C
<b>Tiempo</b>	10 min	120 min	5 min	∞

#### Cuantificación relativa por RT-PCR

La PCR cuantitativa permite monitorizar el desarrollo de la amplificación ciclo tras ciclo gracias a la medición de fluorescencia que se obtiene tras cada uno de los ciclos. En la reacción de PCR, además de la pareja de cebadores, se introduce también un oligonucleótido (sonda) marcado, en su extremo 5', con un fluoróforo, o *reporter*, y en su extremo 3', lleva unido un inhibidor de la fluorescencia o *quencher* de forma que cuando la polimerización tiene lugar, la actividad exonucleasa de la polimerasa, es decir la actividad en sentido 5' - 3', provoca la hidrólisis del oligonucleótido que se encuentra unido al ADNc. Debido a la hidrólisis, el *reporter* y *quencher* se separan de modo que la fluorescencia del reporter ya no queda apantallada por la acción del quencher, siendo ésta capturada por el sistema de RT-PCR. La intensidad de dicha fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de transcritos amplificados. El empleo de la tecnología de las sondas TaqMan proporciona mayor especificidad a la reacción de PCR.

Las reacciones de PCR cuantitativa en tiempo real se llevaron a cabo en placas de 384 pocillos selladas con adhesivo óptico. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Dada la estabilidad de la expresión del gen 18S, se decidió utilizarlo como control interno común a todas las muestras. El equipamiento utilizado fue el sistema **7900HT Fast Real-Time PCR System** y la Mix utilizada, **TaqMan Gene Expression Assays**, todo de Applied Biosystems.

**Tabla 5 . Mezcla re reactivos necesarios para la RT-PCR. \*El ADNc procede de la retrotranscripción de 300 ng de RNA totales.**

<b>Componentes</b>	<b>Volumen (μl) por reacción</b>
<b>TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)</b>	5
<b>20x TaqMan Gene Expression Assays (cebadores + sonda)</b>	0,5
<b>Agua libre de nucleasas</b>	3,5
<b>ADNc*</b>	1
<b>Total por reacción</b>	10

El programa asociado al sistema de detección es el SDS 2.4, también de Applied Biosystem. El programa térmico se empleó en modo “Standard” y es el que sigue en la tabla 6.

**Tabla 6. Programa térmico**

	<b>Paso 1</b>	<b>Paso 2</b>	<b>Paso 3 (40 ciclos)</b>	<b>Paso 4</b>
<b>Temperatura</b>	50°C	95°C	95°C	60°C
<b>Tiempo</b>	2 min	10 min	15 sec	1 min
				∞

Tabla 7. Descripción de las sondas TaqMan empleadas.

Número Identificación	Gen	Tamaño Amplicón
Hs01067802_m1	ABCB1	82
Hs03676540_m1	ABCB5	91
Hs01053790_m1	ABCG2	83
Hs00990732_m1	CD34	91
Hs00175524_m1	CD96	69
Hs01023894_m1	CDH1	61
Hs00983056_m1	CDH2	66
Hs00365052_m1	FN1	82
Hs00174029_m1	KIT	64
Hs00544819_m1	MS4A1	123
Hs01009250_m1	PROM1	75
Hs00195591_m1	SNAI1	66
Hs00950344_m1	SNAI2	86
Hs00234160_m1	SPARC	76
Hs00959010_m1	SPP1	84
Hs00361186_m1	TWIST1	115
Hs99999901_s1	18S	187

El análisis de los datos fue realizado con el **Expression Suite software** y los cálculos se realizaron con hojas de cálculo en Excel (Microsoft Office).

Básicamente hay dos estrategias de cuantificación: cuantificación absoluta y cuantificación relativa. La cuantificación absoluta permite conocer el número exacto de número de copias presentes en la muestra y para ello se necesita tener una curva de calibración. La cuantificación relativa requiere de normalización respecto un gen de referencia endógeno para poder así determinar la cantidad relativa de los genes específicos objetos de estudio con respecto a la cantidad de ARNm del gen de referencia.

**Método de cuantificación relativa**

Método del  $2^{-\Delta Ct}$ , en el que se comparan directamente los valores del ciclo umbral (Ct) de los genes estudiados y los valores de Ct del gen de referencia ( $\Delta Ct$ ) en cada muestra. El cálculo de las eficiencias de las distintas reacciones no se hace necesario, ya que con el empleo de las sondas TaqMan se puede asumir una eficiencia en la amplificación del 100%.

**F.4 SECUENCIACIÓN GENES BRAF Y NRAS**

El estudio del estado mutacional de los genes BRAF y NRAS se llevó a cabo mediante amplificación por PCR seguida y secuenciación directa empleando la metodología Sanger. Para ello se utilizó el mismo ADNc sintetizado para el estudio de expresión génica. Al tratarse de ADNc, la secuencia de los cebadores se diseñó frente a regiones exónicas.

Pasos a llevar a cabo para la secuenciación:

- Técnica de la PCR:

Amplificación del exón 15 de BRAF para el estudio de las mutaciones en el codón 600 del gen BRAF, y amplificación de los exones 2 y 3 del gen NRAS para el análisis mutacional de los codones 12, 13, 60 y 61.

- Visualización de los productos de amplificación en gel de agarosa.

- Purificación de los productos de PCR por tratamiento enzimático

- Reacción de secuenciación: marcaje de los didesoxinucleótidos.

- Purificación de la reacción de secuenciación.

- Secuenciación y análisis de las secuencias.



### **Técnica de la PCR**

En toda reacción de PCR, lo que se pretende es obtener muchas copias de un fragmente específico del genoma. Para conseguir la amplificación de un determinado fragmento del gen deseado, se emplea un par de oligonucleótidos sintéticos, denominados cebadores o primers, de secuencia complementaria a los extremos del fragmento de ADNc a amplificar (Fig 5).

Componentes mínimos de una reacción de PCR: par de cebadores, polimerasa, tampón óptimo para la actividad polimerasa, magnesio, dNTPs y la secuencia molde. Toda reacción de PCR se inicia con un primer paso de desnaturalización o separación por calor de las cadenas complementarias de la que será nuestra secuencia molde. Es por esto que debe emplearse una polimerasa termoresistente ya que la temperatura de desnaturalización es de 95°C. El siguiente paso consiste realizar **40** ciclos de desnaturalización + hibridación de los cebadores + elongación de la cadena de novo. En el paso de hibridación de los cebadores, las muestras se enfrían a una temperatura entre 40-65°C que permita la hibridación de los 2 cebadores. La temperatura exacta a la que se realizará este paso de hibridación depende de la especificidad de la secuencia de los cebadores con la secuencia molde. En el tercer paso, conocido como de elongación, la temperatura es elevada a 72°C, temperatura a la cual la polimerasa sigue añadiendo nucleótidos tras los cebadores y el fragmento ya sintetizado para completar la síntesis de la nueva cadena complementaria.

La PCR se lleva a cabo en un termociclador. Los termocicladores son equipos capaces de ser programados a distintas temperaturas y tiempos. Para realizar esta PCR se empleó el termociclador de *Eppendorf Mastercycler proS*.

Figura 5. Técnica de la PCR

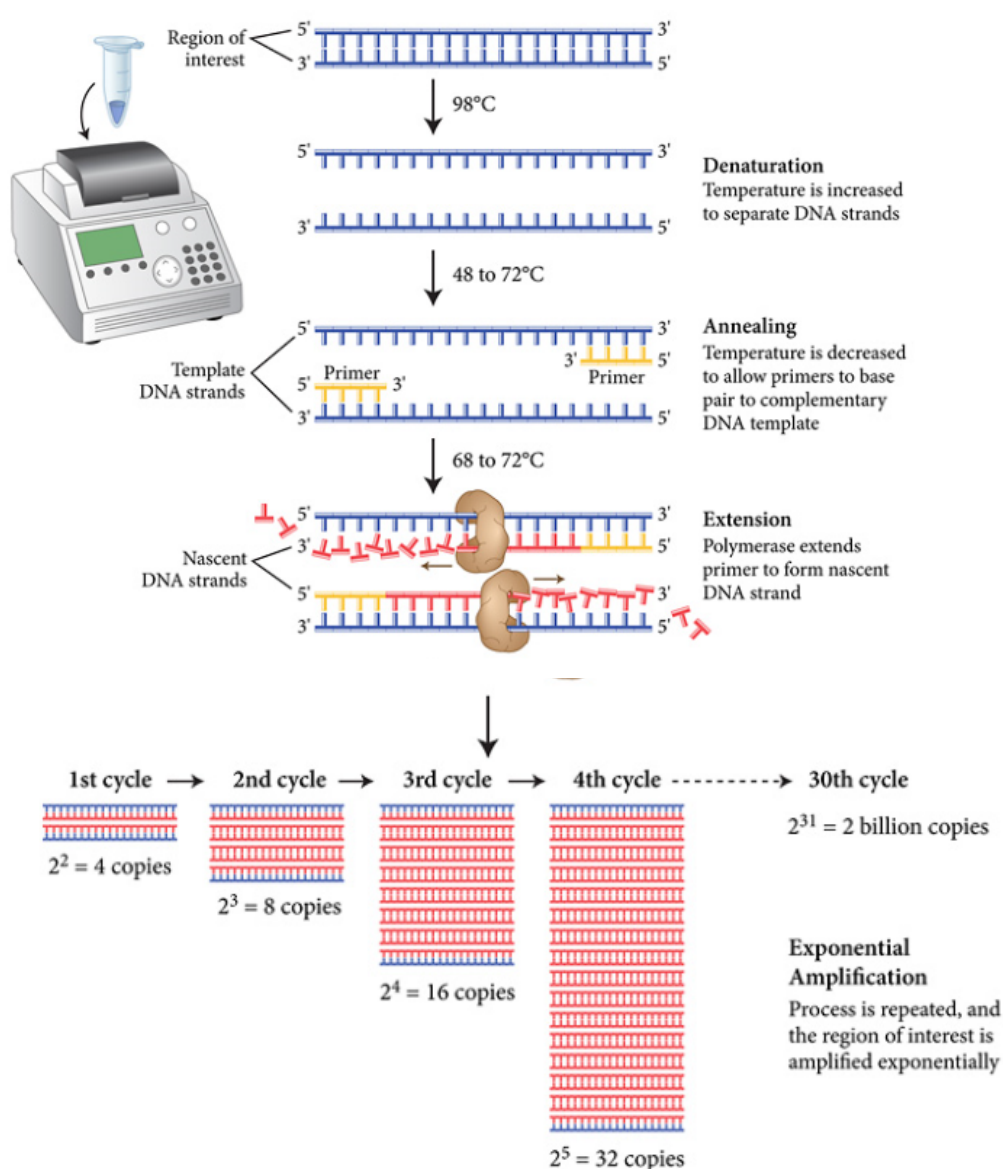


Tabla 8. Mezcla de reacción para PCR de los exones estudiados de los genes BRAF y NRAS.

Componentes					Volumen por reacción (μL)
AmpliTaq	Gold	360	Master	Mix (Applied Biosystems)	12,5
Primer Forward (15 μM)					1
Primer Reverse (15 μM)					1
Agua libre de nucleasas					9,5
ADNc					1
Volumen final					25

**Tabla 9. Ciclo térmico PCR exón 15 gen BRAF.**

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
95	10 min	1
94	45 sec	
55	30 sec	35
72	1 min	
72	10 min	1
4	∞	

**Tabla 10. Ciclo térmico PCR exones 2 y 3 gen NRAS.**

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
95	10 min	1
94	1 min	
55	1 min	38
72	1 min	
72	10 min	1
4	∞	

**Tabla 11. Secuencia de cebadores empleados para la amplificación genes BRAF y NRAS.**

Nombre cebador	Secuencia (5'-3')	Exón	Tamaño amplicón (pb)
ADNcBRAF.RF	GCACAGGGCATGGATTACTT	15	195
ADNcBRAF.RR	GATGACTTCTGGTGCCATCC	15	
ADNcNRAS.RF	TTGAGGTTCTTGCTGGTGTG	2 y 3	249
ADNcNRAS.RR	TCGCCTGTCCTCATGTATTG	2 y 3	

La existencia y especificidad de los productos de PCR fueron verificadas mediante separación electroforética en gel de agarosa al 2% con tinción con RedSafe (ChemBio). Se comprobó el tamaño de banda esperado, su intensidad, la ausencia de posibles amplificaciones inespecíficas así como la ausencia de amplificación en la muestra empleada como control negativo (muestra sin secuencia molde).

### Protocolo de electroforesis en gel de agarosa

La técnica de electroforesis en gel horizontal de agarosa se emplea para separar macromoléculas en función, principalmente, del tamaño y la carga eléctrica. Tal separación tiene lugar por aplicación de una corriente eléctrica que recorre el soporte, en este caso, un gel de agarosa, en cuyo interior se encuentran las muestras. Las moléculas de ADN siempre migran hacia el polo positivo puesto que las moléculas de ADN son polianiónicas. Las bandas generadas como resultado de la amplificación por PCR se visualizan gracias a la tinción del gel con el agente intercalante Redsafe (Biotest) puesto que si está unido a moléculas de ADN de doble cadena fluoresce al ser excitado con luz ultravioleta.

La concentración de agarosa empleada ha sido del 2% puesto que resulta la adecuada según el tamaño de nuestros fragmentos de ADN a separar.

#### **Procedimiento**

1. Preparar tampón de electroforesis TBE al 0,5X y llenar la cubeta de electroforesis. Colocar los peines en la bandeja de electroforesis y delimitarla con un retenedor.
2. Preparar el gel: calentar en el microondas 100ml de tampón de electroforesis con 2 gramos de agarosa. Dejar que la agarosa se disuelva bien, enfriar un poco –sin que llegue a solidificarse el gel- y sólo entonces añadir 5µl del reactivo RedSafe.
3. Verter rápidamente en la bandeja de electroforesis, romper las burbujas y dejar enfriar hasta que una completa solidificación.
4. Colocar la bandeja de electroforesis dentro de la cubeta y cargar las muestras en los pocillos junto con tampón de carga. El tampón de carga contiene azul bromofenol y glicerol. El azul bromofenol es un colorante que se usa para observar el avance del frente y las propiedades del glicerol otorgan densidad a la muestra para que resulte más fácil poder cargarlas en los pocillos.

5. Reservar un pocillo, normalmente el primero, para cargar el marcador de pesos moleculares (8µl), lo que nos permitirá conocer el tamaño de las bandas de nuestras muestras.
6. Tapar la cubeta de electroforesis con la tapa y conectar los electrodos a la fuente de alimentación. Realización de la separación electroforética a 120 voltios durante aproximadamente 30-45 minutos.
7. Transcurrido este tiempo, los fragmentos o bandas se visualizan mediante irradiación con luz UV con la ayuda de un transiluminador. Toma de imágenes con el programa de documentación de geles UviDoc.

#### Purificación de los productos de PCR

Una vez verificada la presencia de una única banda por muestra, los productos de PCR deben ser purificados para eliminar el exceso de nucleótidos y de cebadores y evitar así posibles interferir en aplicaciones posteriores.

Esta purificación se llevó a cabo añadiendo a los productos de PCR el reactivo ExoSAP-IT (Affymetrix) que es una combinación de las enzimas hidrolíticas exonucleasa I y fosfatasa alcalina.

Volúmenes empleados: Añadir 1 µL de ExoSAP-IT en 5 µL de producto PCR. Luego, en un termociclador se incuba la mezcla a 37°C durante 15 minutos para que tenga lugar la degradación de los nucleótidos y cebadores sobrantes y se sigue con un paso final a 80°C durante 15 minutos para la inactivación de las enzimas.

En este momento, el producto de PCR ya está listo para ser secuenciado, en caso contrario se almacena y conserva a -20°C.

#### Reacción de secuenciación

Una vez tenemos el producto de PCR purificado, se lleva a cabo la reacción de secuenciación en la que las bases nucleotídicas de una de las cadenas marcarán fluorescentemente para poder ser detectadas posteriormente. Para ello se empleó el

kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Para realizar la reacción de secuenciación se prepara la mezcla detallada en la tabla 12.

**Tabla 12. Composición mezcla de secuenciación. \*El volumen de agua a añadir varía en función del volumen de producto de PCR añadido.**

Componentes	Volúmenes (μl)
BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer (5X)	1,5
BigDye Ready Reaction Mix	0,5
Primer (3,2 μM)	1
Producto PCR purificado	1-5
Agua libre de nucleasas	2-6*
Volumen final	10

**Tabla 13. Programa ciclo térmico secuenciación de marcaje para secuenciación.**

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
96	1 min	1
96	10 sec	
55	5 sec	36
60	4 min	
4	∞	

#### Purificación de la reacción de secuenciación

La purificación del producto obtenido en la reacción de secuenciación se llevó a cabo utilizando el kit comercial Performa® DTR Gel Filtration Cartridges (EdgeBio Biosystems). El kit está basado en columnas de purificación que deben primeramente centrifugarse durante 3 minutos a una velocidad de 3000 rpm. Se descarta el eluido. Poner la columna en un tubo nuevo de 1,5ml, pipetear los 10 μl del producto de secuenciación (10 μl) en la columna y volver a repetir la centrifugación durante 3 minutos a 3000 rpm para eluir la muestra que ya está preparada para poder ser cargada en el secuenciador

#### Secuenciación

En nuestro caso, el equipo empleado para realizar la secuenciación propiamente dicha fue el ABI PRISM 310 Genetic Analyzer automático (Applied Biosystems) que, como ya

se ha citado anteriormente, se basa en el método de secuenciación de Sanger. El análisis de los electroferogramas obtenidos se llevó a cabo con el programa informático Analysis sequencing v 5.1.1.

Los electroferogramas obtenidos se alinearon frente a la secuencia consenso de los diferentes exones estudiados de BRAF y NRAS de la base de datos del buscador genómico de acceso público Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>).

## 2.2. Parte experimental

### A.- CULTIVOS CELULARES:

El trabajo experimental *in vitro* se realizó en cuatro en líneas celulares establecidas a partir de melanomas. Tres de las líneas establecidas y caracterizadas (SK-MEL 22<sup>136</sup>, WM-115 y WM-266-4<sup>137</sup>) fueron adquiridas comercialmente a (American Type Culture Collection Manassas, VA, USA) (ATCC), y una (Mel-RC08) fue establecida y caracterizada en nuestro laboratorio<sup>138</sup>.

Las líneas celulares fueron:

- SKMEL28 (ATCC® HTB72). Melanoma. (Paciente varón). Piel. Morfología poligonal.
- WM-115 (ATCC® CRL-1676™). Melanoma. (Paciente mujer). Piel. Morfología epitelial (Fig.5)
- WM-266-4 (ATCC® CRL-1676™). Metástasis en piel de melanoma (de la misma paciente de WM-115). Morfología: “epitelial like” (Fig. 6)
- Mel-RC-08. Metástasis pericraneal de melanoma de piel. (Paciente mujer). Morfología: Células pseudoepiteliales de citoplasma denso y núcleos claros con nucléolos marcados.

Las células cultivadas de las distintas líneas establecidas se mantuvieron en medio de cultivo *minimun essential médium* (MEM) suplementado con suero bovino fetal (10%) L-glutamina (1%) y antibióticos para cultivo, estreptomicina y penicilina (1%) y mantenidas en un incubador a 37 °C en condiciones adecuadas de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se cambió 3 veces por semana. Cuando las células alcanzaban la

semiconfluencia, se procedió a subcultivarlas, a su crioconservación o a su recogida para realizar sucesivos estudios, según conveniencia.

Las células en cultivo fueron observadas a diario y fotografiadas en diferentes tiempos y a diferentes aumentos con un microscopio Axiovert 135 (Carl Zeiss, Germany).

#### **Protocolo para el subcultivo (Técnica de Doblaje).**

- Retirar el medio del frasco.
- Lavar agitando suavemente Con PBS (sin calcio ni magnesio) a pH 7.
- Añadir 2,5 mL de Tripsina-EDTA (Gibco BRL), moviendo el frasco, y retirar la cantidad adecuada para que quede el fondo cubierto por la solución; mantener 5 minutos a 37°C.
- Comprobar con el microscopio de contraste de fases que las células se han despegado del fondo del frasco.
- Neutralizar la Tripsina-EDTA con 6 mL de medio completo, agitar para separar los posibles agregados de células.

Centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos.

- Añadir 8 mL de medio completo, resuspender y repartir en 2 frascos.
- Incubar a 37°C en incubador con atmósfera controlada con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Controlar al día siguiente la adhesión de las células al fondo del nuevo frasco.

Cambiar el medio 2 o 3 veces por semana.

#### **Crioconservación de las células cultivadas**

Es conveniente congelar células de distintos pases de los cultivos, para disponer de material sobre el que realizar estudios posteriores. El momento óptimo es aproximadamente cuando las células en cultivo presentan un 80% de la confluencia.

Procedimiento:

- Retirar el medio del frasco.
- Lavar agitando suavemente Con PBS (sin calcio ni magnesio) a pH 7.
- Añadir 2,5 mL de Tripsina-EDTA (Gibco BRL), moviendo el frasco, y retirar la cantidad adecuada para que quede el fondo cubierto por la solución; mantener 5 minutos a 37°C.



- Comprobar con el microscopio de contraste de fases que las células se han despegado del fondo del frasco.
- Neutralizar la Tripsina-EDTA con 8 mL de medio completo, agitar para separar los posibles agregados de células.
  - Centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos.
  - Resuspender el sedimento en 1,2 mL de medio completo suplementado con 5% de dimetilsulfóxido (Sigma Aldrich).
  - Se pasa la suspensión celular a un vial de congelación
  - Mantener en atmósfera de N<sub>2</sub> líquido durante 2 horas.
  - Pasar a N<sub>2</sub> líquido (-196 °C) y mantener hasta que se necesiten las células para nuevos estudios.
  -

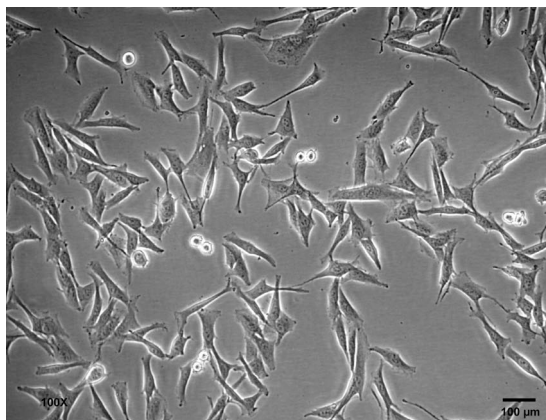
#### **Descongelación de las células.**

Cuando se necesitaron células para la realización de nuevos estudios, se procedió a descongelar los viales mantenidos en nitrógeno líquido.

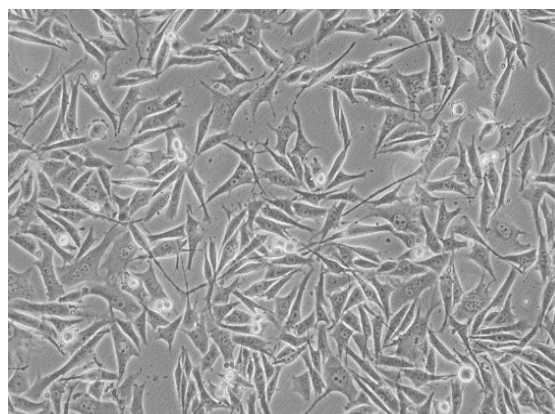
#### **Procedimiento**

- Se extraen los viales con las células congeladas.
- Se introducen los viales rápidamente en un baño a 37°C hasta que su contenido pasa a una fase líquida.
- Se rocía el vial con alcohol de 70°, se deja evaporar éste .
- Se procede, rápidamente, a trasvasar el medio con las células a un tubo cónico que contiene 8 ml de medio de cultivo completo.
- Se centrifuga a 1200 rpm durante 7 minuto.
- Se resuspende el sedimento celular en 4 ml de medio completo.
- Se siembra en frascos Falcon de 25 cm<sup>2</sup> y se lleva al incubador a 37°C y atmósfera controlada.
- Al día siguiente se observa el cultivo con el microscopio de contraste de fases.
- Se cambia el medio de cultivo tres veces por semana.

Figura 6. Imagen de las células de las líneas WM-266 y MEL-RC-08 en cultivo



WM-266



MEL-RC-08

## B.- XENOTRANSPLANTES

### B.1. Líneas celulares de tumor primario y de tumor metastásico:

Las líneas celulares WM-115, procedente de un tumor primario y la WM-266-4 derivada de una metástasis del tumor primario de WM-115, (establecidas del mismo paciente) se inocularon en ratones atímicos *BALB/c athymic nude mice* (Charles River, Spain) de entre cuatro y seis semanas de edad, a razón de  $2 \times 10^6$  células resuspendidas en 200  $\mu$ l de PBS.

Se inocularon 10 ratones con células de cada línea, 5 por vía subcutánea y 5 intramuscular. Los inoculados con la línea WM-115 se denominaron L1, y los inoculados con la línea WM-266-4, se denominaron L2.

Los ratones se mantuvieron en condiciones especiales de asepsia y se observaron diariamente. Cuando fue evidente la presencia de tumores, estos se midieron periódicamente hasta que alcanzaron aproximadamente 1 cm de diámetro máximo, momento elegido para el sacrificio de los animales. Las muestras tisulares obtenidas de cada uno de los tumores se dividieron en 4 fragmentos:

- uno fijado en formalina para procesar en parafina y realizar el estudio histológico e inmunohistoquímico,
- uno se envió en fresco y en condiciones de esterilidad al laboratorio de cultivos y de biología molecular. Se separaron muestras para:

- Cultivos
- Obtención de ARN
- Estudio por citometría de flujo de marcadores (Centro de investigación Príncipe Felipe)

- otro se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  para realizar posteriores estudios.

Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con las recomendaciones y pautas para el cuidado adecuado de los animales de laboratorio y fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico Universitario (Incliva) de Valencia.

A causa de las diferencias en la velocidad de crecimiento, los tumores procedentes de la línea WM-266-4 se obtuvieron a los 35 días tras la inoculación y los procedentes de la línea WM-115 a los 77 días de la inoculación.

### **Cultivo de los xenotransplantes**

La muestra tumoral se recogió en medio MEM suplementado con antibióticos: penicilina, estreptomycin y gentamicina, y mantenida a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su procesamiento.

### **Procedimiento**

- Los tumores se trocearon en fragmentos de  $1\text{mm}^3$  aproximadamente.
- Se disgregaron en medio de cultivo suplementado con colagenasa al 0,02% (Sigma-Aldrich).
- Centrifugación a 1200 rpm durante 7 min.
- El sedimento celular se resuspendió en 8 medio completo
- Centrifugación a 1200 rpm, 7 min.
- Las células se resuspendieron en 8 mL de medio completo.
- Las células se sembraron en dos frascos Falcon de  $25\text{ cm}^2$ .

Los cultivos se mantuvieron en condiciones apropiadas para establecer nuevas líneas tras el xenotransplante.

Se obtuvieron **5 líneas de WM-115 y 6 de WM-266-4.**

### B.2.-Xenotrasnplante de SKMEL28 CD133+/- seleccionadas por citometría de flujo, y MELRC08.

En un segundo tiempo, se procedió a seleccionar las células de la línea comercial SK-MEL-28 por citometría de flujo en función de la expresión del marcador de célula madre CD133. Se descongeló previamente y se puso en cultivo, expandiéndola hasta obtener  $80 \times 10^6$  células. Se determinó el porcentaje de células CD-133+ en la línea original, que resultó ser de un 13%.

Se procedió a la inoculación de 50 000 células CD133+, resuspendidas en 0,2 mL de PBS., por vía intravenosa en un ratón, y por vía subcutánea/intramuscular a otro ratón, pero este último murió al día siguiente de la misma. Los ratones se denominaron L3.

Paralelamente, se incubaron 400 000 células SK-MEL28/CD133-, y 400 000 de la línea MEL-RC-08, por vía intravenosa (2 ratones por línea), y subcutánea (1 ratón por línea).

En la tabla 14 se resume la vía de inoculación y expresión de CD133 para las dos líneas celulares utilizadas en esta experiencia.

Tabla 14.-Línea inoculada, vía de inoculación y expresión de CD133 en la experiencia con ratones nude L3.

	LÍNEA CELULAR	VÍA DE INOCULACIÓN	CD133
L3R1	SK-MEL-28	Intravenosa	Negativo
L3R2	SK-MEL-28	Intravenosa	Negativo
L3R3	SK-MEL-28	Subcutánea	Negativo
L3R4	SK-MEL-28	Intravenosa	Positivo
L3R5	SK-MEL-28	Intravenosa	Positivo
L3R6	MELRC08	Intravenosa	Positivo
L3R7	MELRC08	Intravenosa	Positivo
L3R8	MELRC08	Subcutánea	Positivo

### B.3. Xenotrasnplante de SKMEL28 CD133+/- seleccionadas mediante separación magnética

Con el método citado previamente se obtuvieron pocas células CD133+, por lo que, en una tercera etapa, se seleccionaron las células de la línea celular mencionada en función de la expresión de CD133, mediante separación magnética (MACs, MidiMACs). De acuerdo con el siguiente protocolo.

1. Eliminación de células muertas: se centrifuga por gradiente de densidad, y se añade el kit "*dead cell removal*" (nº 130-090-101)
2. Muestreo magnético:
 

(trabajar rápidamente y mantener células frías)

  - determinar el número de células
  - centrifugar la suspensión a 300xg, 10 minutos. Aspirar el sobrenadante
  - resuspender las células en 300 µL de buffer por cada  $10^8$  células.
  - Añadir 100 µL de *FcR Blocking Reagent* por cada  $10^8$  células.
  - Añadir 100 µL de *CD133 Micro Beads* por cada  $10^8$  células.
  - Mezclar bien. Incubar 30 minutos en refrigerador (2-8°C)
  - lavar en 1-2 mL de buffer/  $10^8$  células y centrifugar a 300 cgs, 10 min. Aspirar el sobrenadante.

Resuspender hasta  $10^8$  células en 50 µL de buffer
3. Separación magnética:
  - Seleccionar columna MAC: LS y separador MAC: MidiMACS, en función del número de células y del número de células CD133+.
  - Esperar siempre a que el reservorio de la columna esté vacío antes de iniciar el siguiente paso.
    - 1.Introducir la columna en el campo magnético del separador MAC.
    - 2.Lavar la columna con 3 mL de buffer.
    - 3.Introducir la suspensión. Guardar las células no seleccionadas.
    4. Limpiar la columna con 3 mL de buffer, 3 veces. Las células no seleccionadas (las que salgan) se mezclan con las del paso 3.
    - 5.Retirar la columna del separador e introducirla en un tubo de colección.
    - 6.Pipetear 5mL de buffer y apretar fuertemente el émbolo para soltar las células seleccionadas.

El proceso se repitió tres veces para asegurar la correcta separación. Se comprobó la expresión de CD133 en las fracciones resultantes mediante citometría de flujo (Centro de Investigación Príncipe Felipe). Se obtuvieron  $3,365 \times 10^6$  células CD133+, que se inocularon en 6 ratones atímicos, a razón de 56.000 células por inoculación. Paralelamente, de la fracción CD133-, se inocularon también  $0,5 \times 10^6$  células. Cada

línea se inyectó en la vena central de la cola (4 ratones por línea) y de manera subcutánea (2 ratones por línea). Además, se inocularon de la línea MEL-RC08,  $0,5 \times 10^6$  células en dos ratones y  $1 \times 10^6$  células en otros dos, en la vena central de la cola, y  $1 \times 10^6$  células por vía intramuscular y subcutánea en otros 2 (total: 18 ratones, denominados L4)

En la tabla 15 se expone la vía de inoculación y la expresión de CD133 para las líneas inoculadas en los ratones L4 tras la separación magnética.

**Tabla 15. Línea celular, vía de inoculación y expresión de CD133 en los xenotransplantes de los ratones L4, tras separación magnética**

	LÍNEA CELULAR	VÍA DE INOCULACIÓN	CD133
L4R1	SK-MEL-28	Intravenosa	+
L4R2	SK-MEL-28	Intravenosa	+
L4R3	SK-MEL-28	Intravenosa	+
L4R4	SK-MEL-28	Intravenosa	+
L4R5	SK-MEL-28	Intravenosa	-
L4R6	SK-MEL-28	Intravenosa	-
L4R7	SK-MEL-28	Subcutánea	+
L4R8	SK-MEL-28	Subcutánea	+
L4R9	SK-MEL-28	Subcutánea	-
L4R10	SK-MEL-28	Subcutánea	-
L4R11	MELRC08	Intravenosa	+
L4R12	MELRC08	Intravenosa	+
L4R13	MELRC08	Intravenosa	+
L4R14	MELRC08	Intravenosa	+
L4R15	MELRC08	Subcutánea	+
L4R16	MELRC08	Subcutánea	+

En todos los casos, se evaluó la velocidad de crecimiento tumoral mediante mediciones del tamaño tumoral con carácter periódico.

Tras su sacrificio, a los 43 días, las muestras tisulares obtenidas, tanto en los tumores subcutáneos como en las metástasis, fueron separadas en 4 fragmentos:

- uno congelado en isopentano enfriado en nitrógeno líquido, y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización en el laboratorio de biología molecular.
- otro introducido en medio de cultivo para el laboratorio de cultivos .
- otro en fresco, en condiciones de esterilidad, para citometría de flujo.
- y otro en formol, para inclusión en parafina. Se obtuvieron de la muestra en parafina secciones de aproximadamente  $4\text{ }\mu\text{m}$  de espesor, sobre las que se realizó el estudio morfológico.

### C. CITOMETRÍA DE FLUJO

Para la detección de biomarcadores de CMC y de EMT mediante citometría de flujo, las células tumorales fueron despegadas, lavadas y resuspendidas en medio de cultivo a  $10^6$  células por mL. Posteriormente, se incubaron  $100\text{ }\mu\text{L}$  de esta suspensión celular con cada uno de los anticuerpos y sus correspondientes controles isotópicos, con el anticuerpo primario no conjugado para ABCB5 (utilizando el anticuerpo secundario solamente como control). Tras la incubación, las células teñidas con los anticuerpos conjugados se lavaron con PBS enfriado en hielo, y resuspendidas en  $500\text{ }\mu\text{L}$  de medio de cultivo para el análisis por citometría de flujo , con el citómetro FC500 MCL (Beckman-Coulter, CA, USA)

Los anticuerpos empleados fueron CD20, CD90, CD34 y CD117, con sus controles isotópicos, de la casa comercial Beckman-Coulter. Los anticuerpos para CD271, cadherina-N y sus correspondientes controles isotópicos se obtuvieron de BD Pharmingen. Los anticuerpos frente a ABCG2, y cadherina E, así como los controles isotópico fueron suministrados por R&D Systems. Los anticuerpos frente a CD133, y su control isotópico correspondiente, eran de la casa comercial Mylteni Biotec. El anticuerpo frente a ABCB5 no conjugado, se adquirió de la casa comercial Santa Cruz, y se detectó utilizando un anticuerpo secundario marcado con FITC (R&D Systems).

### 2.3. Estudio estadístico

La asociación lineal entre dos variables cuantitativas se analizó mediante el coeficiente de correlación lineal de Pearson. Si las variables no cumplían criterio de normalidad, se aplicó el coeficiente de correlación ordinal de Spearman.

Para comparar variables cualitativas, se utilizaron las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis si la variable cualitativa incluía más de dos categorías, o la U de Mann-Whitney si la variable cualitativa incluía dos categorías.

También se ha realizado un análisis de regresión logística multivariante analizando la variable desarrollo de metástasis con las variables pronósticas clásicas, utilizando los métodos de inclusión por pasos para las variables de expresión génica e inmunohistoquímica estudiadas, fijando el modelo final con aquellas variables que producían un cambio significativo.

Se calculó la curva COR (*receiver operating characteristic*), exponiendo las áreas bajo la curva, para los diferentes modelos predictivos.

Para todos los contrastes de hipótesis realizados se consideró significativa toda diferencia que mostrase un valor de  $p < 0,05$ .

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS para Windows, versión 19 (SPSS INCm, Chicago, IL, EEUU).

**Estadística descriptiva:**

Se emplea para estudiar los diferentes aspectos o caracteres referidos a un conjunto de elementos de naturaleza específica, y que reciben la denominación de variables.

El primer paso para el estudio estadístico fue el análisis, en forma descriptiva de las variables cuantitativas, que se expresaron en la mayoría de ocasiones como mediana +/- desviación estándar y rango, y de las cualitativas, que se expresaron como valores absolutos y porcentajes.

**Estadística de inferencia:**

Permite extrapolar los resultados de la muestra a la población que se está estudiando.



Comprende las denominadas “pruebas paramétricas” en las que la población estudiada sigue una distribución normal, y la “pruebas no paramétricas”. Estas últimas son pruebas que por no depender de la distribución de la variable, no precisan de la condición previa de normalidad, y no manejan los valores cuantitativos que toma la variable en cuestión, sino únicamente sus rangos. Son pruebas de menor precisión que las paramétricas, por lo que sólo se mostrarán como significativas diferencias mayores. El uso de los test no paramétricos se limita a estudios con tamaños muestrales menores de 30 en las que las poblaciones no pueden ser consideradas como normales, o bien cuando la variable represente solamente una medida aproximada del carácter, sin una valoración exacta.

En función de las variables estudiadas y del tamaño de la muestra se han empleado los siguientes test de hipótesis para la **asociación estadística entre dos variables (tablas 16 y 17)**:

**Tabla 16. Test paramétricos**

VARIABLE 1	VARIABLE 2	TEST DE HIPÓTESIS
Dicotómica	Dicotómica	Chi Cuadrado Test exacto de Fisher
Cualitativa (>2 categorías)	Cualitativa (>2 categorías)	Chi Cuadrado
Dicotómica	Cuantitativa	t de Student
Cualitativa (>2 categorías)	Cuantitativa	Análisis de la varianza
Cuantitativa	Cuantitativa	Coeficiente de correlación de Pearson

Tabla 17. Test no paramétricos

VARIABLE 1	VARIABLE 2	TEST DE HIPÓTESIS
Dicotómica independiente	Cuantitativa ( $n < 30$ ) u ordinal	U de Mann Whitney Test de Wilcoxon
Dicotómica pareada o dependiente	Cuantitativa ( $n < 30$ ) u ordinal	Test de Wilcoxon
Cualitativa (>2 categorías)	Cuantitativa ( $n < 30$ ) u ordinal	Kruskal Wallis
Cualitativa pareada (>2 categorías)	Cuantitativa ( $n < 30$ ) u ordinal	Test de Friedman
Ordinal	Ordinal	Rho de Spearman

**Pruebas estadísticas empleadas en este trabajo:****Prueba de Kruskal-Wallis para varias muestras independientes:**

Se utiliza para constatar si la distribución de un parámetro, cuando menos ordinal, es o no la misma en más de dos muestras independientes. Se trata por tanto de un método no paramétrico para probar si un grupo de datos proviene de la misma población.

**Prueba de U de Mann-Whitney para dos muestras independientes:**

Se utiliza para constatar si la distribución de un parámetro, cuando menos ordinal, es o no a misma en dos muestras independientes. Por tanto, se ha empleado para constatar la homogeneidad de la distribución de una variable, cuando menos ordinal, en dos muestras independientes.

**Prueba de Chi-cuadrado (y2 de Pearson):**

Se ha utilizado como prueba de asociación o dependencia entre dos variables cualitativas (categóricas) siempre que la frecuencia esperada de las celdas en la tabla de contingencia haya sido superior a 5 casos. En caso contrario, y sólo para variables dicotómicas, se ha empleado el test exacto de Fisher (cuando el valor esperado de una o más celdas era inferior)

**Coefficiente de correlación de Pearson:**

Se ha empleado como una medida de la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas. El valor del índice de correlación ( $r$ ) varía en el intervalo  $[-1, 1]$ :

-Si  $r=1$ , existe una correlación positiva perfecta. El índice establece una dependencia total entre las dos variables denominada *relación directa*. Cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace en proporción constante.

-Si  $0 < r < 1$ , existe una correlación positiva (cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace).

-Si  $r=0$ , no existe relación lineal, pero sin implicar necesariamente que las variables sean independientes, ya que pueden existir relaciones no lineales entre ambas.

-Si  $-1 < r < 0$ , existe una correlación negativa (cuando una de ellas aumenta, la otra disminuye)

-Si  $r=-1$ , existe una correlación negativa perfecta. El índice establece una dependencia total entre las dos variables denominada *relación inversa*. Cuando una de ellas aumenta, la otra disminuye en proporción constante.

**Regresión logística:**

El modelo multivariante logístico expresa la probabilidad de que se desarrollen metástasis a distancia en función de una serie de variables independientes.

El modelo logístico expresa el *odds* (o razón entre desarrollar metástasis a distancia o no hacerlo) como función exponencial de las variables independientes.

La ecuación resultante con las variables obtenidas en el análisis de esta muestra, que predice la posibilidad de que un melanoma primario de metástasis a distancia en su curso evolutivo, sería la siguiente: Probabilidad de metástasis a distancia =  $1 / (1 + e^{-(\beta_0 + \sum \beta_i x_i)})$ , donde  $X_i$  son las variables independientes (Breslow, ulceración, expresión de CD133, expresión de ON/SPARC) y los  $\beta_i$  son los coeficientes de regresión, que al igual que  $\beta_0$ , se estiman en el análisis.

**Curva ROC:**

La curva ROC surgida del análisis de regresión logística representa la sensibilidad y especificidad en función de distintos puntos de corte, que se corresponden con los valores proporcionados por los propios test.

Se estima el área bajo la curva como un indicador de la bondad de ajuste de la clasificación, y se interpreta como la probabilidad de acertar en el pronóstico del melanoma, con respecto al desarrollo de metástasis a distancia. La información se completa con la estimación de un intervalo de confianza al 95% para el valor del área.

**Curva de Kaplan Meyer**

Conocido también como del “límite del producto”. La característica distintiva del análisis con este método es que la proporción acumulada que sobrevive se calcula para el tiempo de supervivencia individual de cada paciente y no se agrupan los tiempos de supervivencia en intervalos. Por esta razón es especialmente útil para estudios que utilizan un número pequeño de pacientes. El método de Kaplan- Meier incorpora la idea del tiempo al que ocurren los eventos.

La validez de este método descansa en dos suposiciones:

1. Las personas que se retiran del estudio tienen un destino parecido a las que quedan.
2. El período de tiempo durante el cual una persona entra en el estudio no tiene efecto independiente en la respuesta.

### **3. Resultados y desarrollo argumental**



### 3. RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

#### I-ESTUDIO EN MELANOMAS HUMANOS

##### I.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

La tabla 18 recoge las características histopatológicas y clínicas de las muestras seleccionadas para los melanomas primarios (n=70), y en la tabla 19 se muestran los resultados del seguimiento clínico de los pacientes.

**Tabla 18. Características histológicas y clínicas en los melanomas primarios seleccionados para el estudio.**

Variable	Nº de casos (%)
Género	
Femenino	46 (65,71)
Masculino	24 (34,29)
Edad	
<60	32 (45,71)
≥60	38 (54,29)
Localización	
Extremidades	28 (40)
Tronco	36 (51,43)
Cabeza y cuello	6 (9,57))
Breslow	
<1	31 (44,29)
≥1	39 (55,71)
Ulceración	
No	53 (75,71)
Sí	17 (24,29)
Infiltrado Linfocitario	
Ausente	16 (22,86)
Discontinua	41 (58,57)
Continua	13 (18,57)
Regresión	
Ausente	47 (67,14)
Presente	23 (32,86)
Fase Vertical	
Ausente	24 (34,29)
Presente	46 (65,71)
Tipo histológico	
Extensión superficial	52 (74,29)
Sobre lentigo maligno	4 (5,71)
Lentiginoso acral	5 (7,14)
Nodular	9 (12,86)

Tabla 19. Seguimiento clínico de los casos estudiados

Melanomas primarios (n=70)		
Variable	Nº de casos (%)	IL [mediana(rango)]
Metástasis en tránsito		2148 (0-4031)
No	59 (86,76)	
Sí	9 (13,24)	
Metástasis ganglionar		2182 (0-4031)
No	56 (81,16)	
Sí	13 (18,84)	
Metástasis a distancia		2210 (0-4031)
No	53 (76,81)	
Sí	16 (23,19)	
Cerebral	3 (18,75)	
Ósea	4 (25)	
Pulmonar	11 (68,75)	
Ganglionar a distancia	6 (37,5)	
Hepática	5 (31,25)	
Cutánea a distancia	3 (18,75)	
Exitus		2241 [197-4031]
No	54 (79,41)	
Sí	14 (20,59)	
IL: Intervalo libre		

## I.2. FACTORES DE TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL Y PROGRESIÓN TUMORAL

### I.2.1. Relación con la fase de crecimiento tumoral:

#### I.2.1.1. Estudio inmunohistoquímico:

En los melanomas primarios, se encontraron diferencias significativas en la expresión inmunohistoquímica entre aquellos que se encontraban en fase de crecimiento radial y los que estaban en fase de crecimiento vertical. En los segundos, se observó una mayor intensidad de inmunotinción frente a **cadherina-N** ( $p=0,033$ )(tabla 20)(Fig. 7 y 8), y mayor porcentaje de células positivas frente a **osteonectina/SPARC** ( $p=0,011$ ). (tabla.21)(Fig. 9 y 10)



Tabla 20. Relación entre la intensidad de tinción para cadherina-N y la fase de crecimiento

V.H	N				p	Prueba
Fase	N-cadh_i					
	0	1	2	3		
Radial	4	7	1	5	0,02	KW
Vertical	0	19	6	10	1	
Total	4	26	7	15		

V.H: variable histológica

N: número de casos

N-cadh\_i: intensidad de tinción de cadherina-N  
(0=ausencia, 1=débil; 2=moderada, 3=intensa)

Fase: 0=fase radial; 1=fase vertical

Tabla 21. Variables IHQ de EMT en relación con la fase de crecimiento tumoral

V.IHQ	Fase vertical (N)		Prueba	p
	No	Sí		
N-cadh	17	35	MW	0,709
ON	16	35	MW	0,011
FN	17	35	MW	0,535
OP	16	35	MW	0,131

V. IHQ: variable inmunohistoquímica

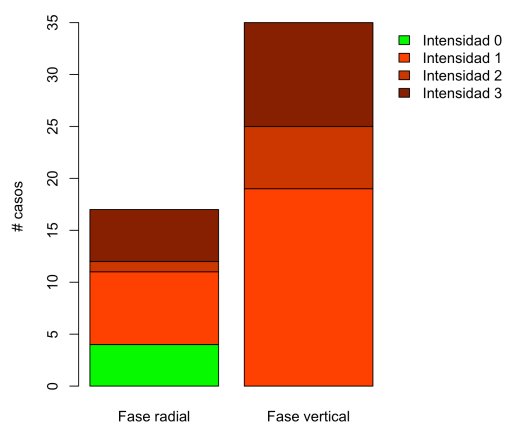
(N): número de casos

N-cadh: Cadherina-N

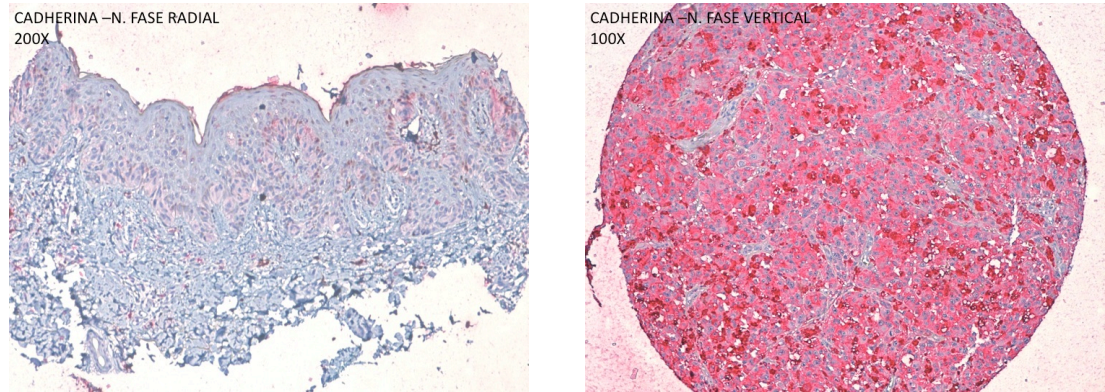
MW: Mann Withney

p: significación estadística

Figura 7. Intensidad de tinción frente a cadherina-N en melanomas en función de la fase de crecimiento

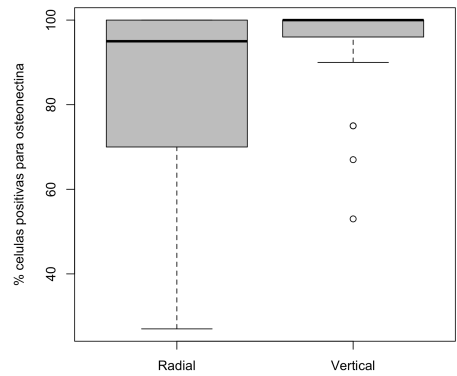


**Figura 8. Tinción inmunohistoquímica para Cadherina-N en melanomas primarios en fase radial y vertical**

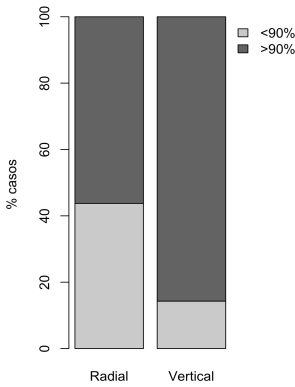


**Figura 9.A Porcentaje de células positivas frente a osteonectina (ON/SPARC) en función de la fase de crecimiento. 2B: Proporción de células con positividad mayor o igual al 90% para ON/Sparc.**

A



B

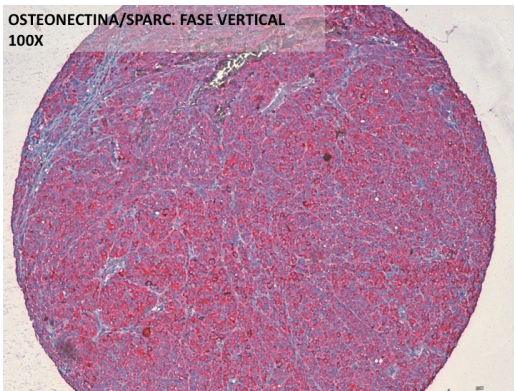


**Figura 10. Tinción inmunohistoquímica para osteopontina/SPARC en melanomas primarios en fase radial (A) y vertical (B).**

A



B



### I.2.1.2. Estudio por RT-PCR:

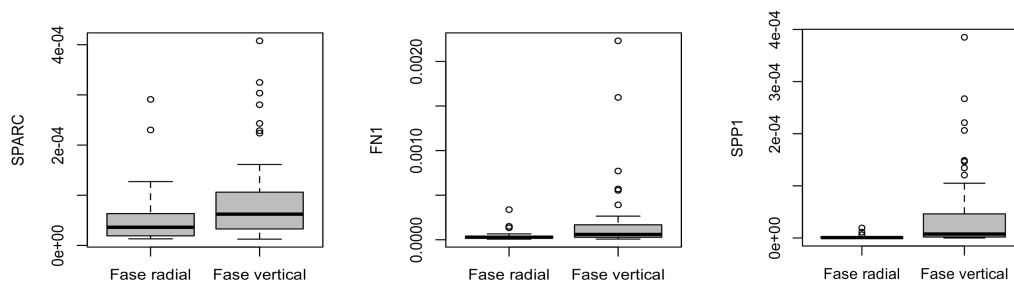
Del mismo modo, en los melanomas en fase de crecimiento vertical se observó una mayor expresión de ARNm de osteonectina/SPARC, fibronectina 1, y osteopontina (SPP1). (Tabla.22) (Fig.11)

**Tabla 22. Comparación de la expresión génica de marcadores de EMT, en la fase radial y en la fase vertical (Test de Mann Withney). (Se reflejan únicamente los parámetros con significación estadística).**

Gen	Fase vertical	N	P	Prueba
FN1	NO	21	0,007	MW
	SÍ	44		
ON/SPARC	NO	21	0,045	MW
	SÍ	44		
SPP1(OP)	NO	21	0,000	MW
	SÍ	44		

(N): se indica entre paréntesis en número de casos evaluados

**Figura 11. Expresión de SPARC, FN1, Spp1 en función de la fase de crecimiento**



Así, los factores de EMT: fibronectina, osteopontina, y osteonectina/SPARC, mostraban una expresión de ARN aumentada, observándose una correlación con la inmunotinción para osteonectina/SPARC en la fase de crecimiento vertical. Sin embargo, esta correlación se pierde en la expresión de FN y OP, que no muestran un aumento significativo en la inmunotinción. Por otro lado hay mayor inmunotinción para Cadherina-N en la fase vertical, sin aumento en la expresión de ARNm.

### I.2.2.Relación con la fase evolutiva del espectro de progresión tumoral (melanoma primario delgado, melanoma primario grueso, metástasis en tránsito, metástasis ganglionar, metástasis a distancia)

#### I.2.2.1. Estudio inmunohistoquímico:

La tabla 23 refleja los resultados del estudio de expresión inmunohistoquímica de los factores de EMT, en relación con la fase de progresión tumoral. Los parámetros no reflejados (OP, FN, cadherina-N) no mostraron significación estadística.

**Tabla 23. Correlación entre la expresión de ON/SPARC, y las fases evolutivas (tipos).**

Parámetro IHQ	Fase de evolución	N	KW	Mann-Whitney	
				Parámetro	p
ON/SPARC	1	24	p=0,011	3 vs 4	
	2	27		4 vs 5	0,063
	3	21			0,207
	4	19		1+2 vs 4	0,003
	5	13			
	Total	104			

N: número total de casos

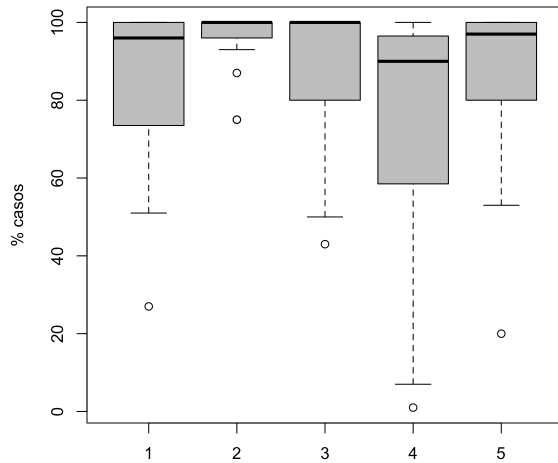
KW: Kuskal Wallis

Fase de evolución: 1: MP delgados, 2: MP gruesos, 3: MT, 4: MG, 5: MD

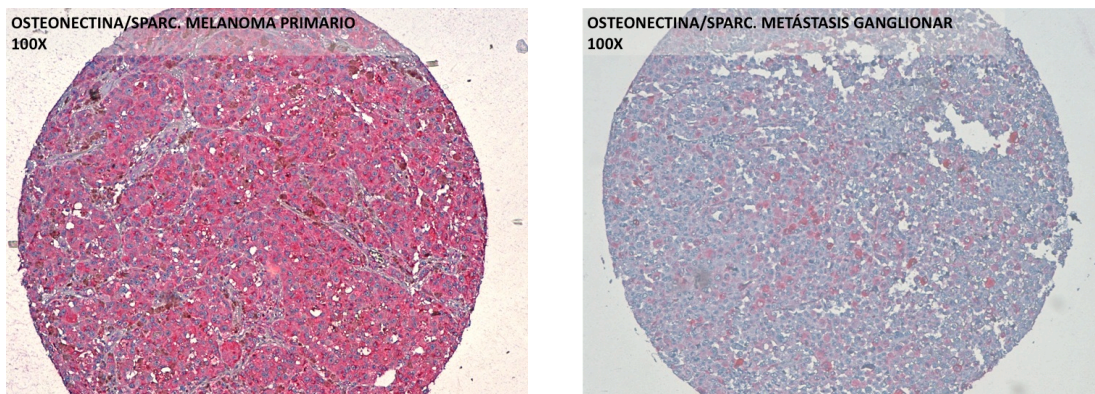
##### I.2.2.1.1. Osteonectina/SPARC

Las metástasis ganglionares presentaron menor porcentaje de células positivas en el estudio inmunohistoquímico con **ON/SPARC** que los melanomas primarios (p=0,003). (Fig. 12 y 13) .

**Figura 12. Porcentaje de células tumorales con tinción citoplasmática frente a osteonectina/SPARC en las distintas fases de diseminación**



**Figura 13. Tinción inmunohistoquímica para ON/SPARC en melanoma primario y metástasis ganglionar**



#### I.2.2.1.2. Osteopontina

La intensidad de inmunotinción frente a OP, fue menor (nula o débil) en las metástasis, que en los demás tipos ( $p=0,003$ ), y en comparación con los primarios ( $p=0,003$ ). Por otro lado, la intensidad fue mayor en las metástasis ganglionares que en las metástasis a distancia ( $p=0,018$ )(tabla 24)(Fig. 14 Y 15). El porcentaje de células positivas para OP, aunque se reduce en las metástasis ganglionares y a distancia, no presenta diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 24. Relación entre la intensidad de inmunotinción con OP, y la fase de evolución tumoral:

Parámetro clínico	N			Prueba		
	OP_i			KW	MW	
	0	1	2		Valores	p
Fase de evolución						
1	5	18	0	P=0,014	1+2+3+4 vs 5	0,003
2	2	20	4			
3	5	16	0		1+2 vs 5	0,003
4	3	15	1			
5	7	6	0		3+4 vs 5	0,018
Total	22	75	5			

OP-i: intensidad de tinción frente a OP (0=negativo, 1=débil, 2=moderado o intenso)

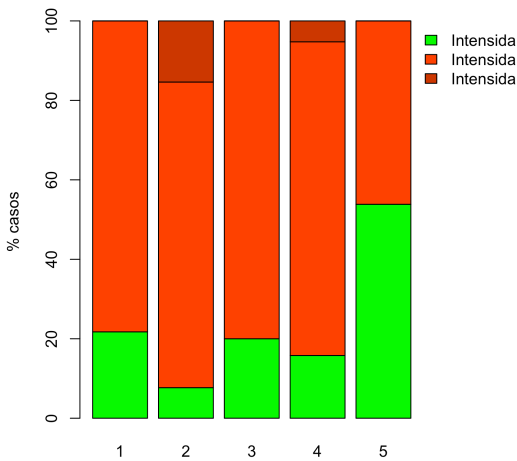
Fase de evolución: 1=melanoma primario delgado, 2= melanoma primario grueso, 3=metástasis en tránsito, 4=metástasis ganglionar, 5= metástasis a distancia

KW: Kruskal Wallis.

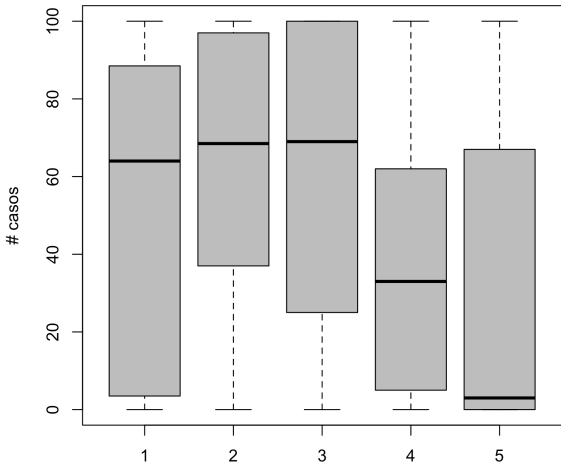
MW: Mann Whitney

Figura 14A. Intensidad de tinción y porcentaje de células positivas frente a Osteopontina en las diferentes fases de diseminación del melanoma. 13B. Porcentaje de células con tinción para osteopontina.

A.

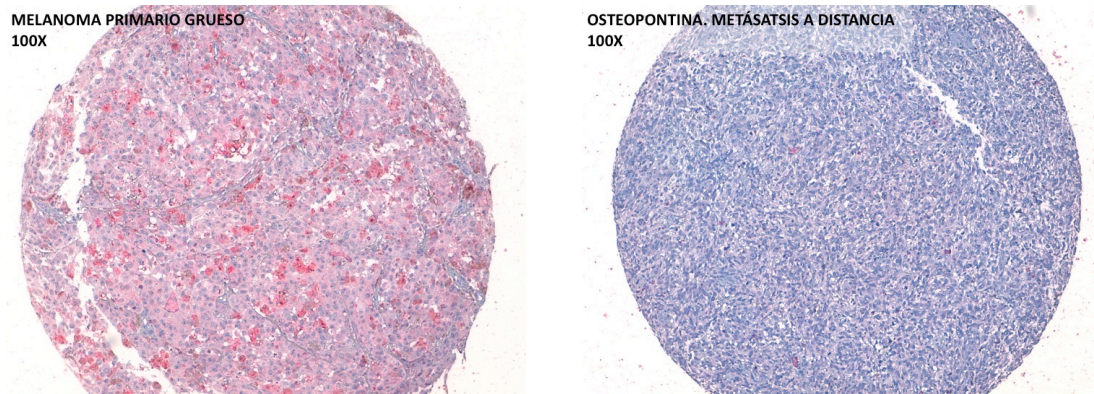


B





**Figura 15. Tinción inmunohistoquímica para Osteopontina en melanomas primarios y metástasis**



#### I.2.2.1.3. Cadherina-N

Se observó mayor expresión citoplasmática de cadherina-N en melanomas primarios que en metástasis a distancia ( $p=0,000$ )(Tabla 25).

Se observó asimismo una variación de la intensidad de tinción en las diferentes fases de evolución ( $p=0,001$ ) (Tabla 26). Destacó que la intensidad de tinción es menor en las metástasis a distancia que en el resto de fases (Fig. 16).

**Tabla 25. Diferencias en la tinción citoplasmática de cadherina-N para las fases de evolución**

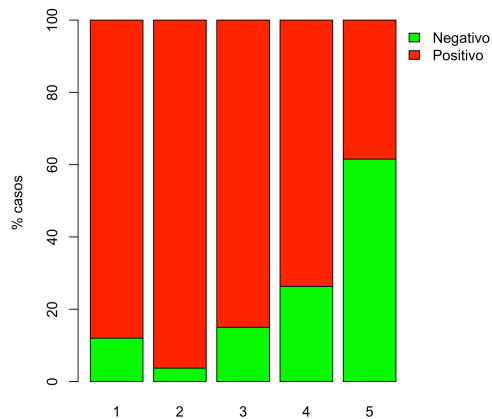
Parámetro histológico	N		Prueba		
Fase evolutiva	N-cadh_C		KW	MW	
	0	1		Valores	p
1	3	22	P=0,000	1+2 vs 5	0,000
2	1	26			
3	3	18			
4	5	14			
5	8	5			
Total	20	85			

N-cadh\_C: tinción citoplasmática para cadherina-N (0=ausencia, 1=presencia)  
N: número de casos  
Fase de evolución: 1=melanoma primario delgado, 2= melanoma primario grueso, 3=metástasis en tránsito, 4=metástasis ganglionar, 5= metástasis a distancia  
KW: Kruskal Wallis  
MW: Mann Withney

**Tabla 26. Correlación entre la intensidad de inmunotinción para cadherina-N y las fases de evolución**

Parámetro histológico	N				Prueba
Fase de evolución	N-cadh_i				KW
	0	1	2	3	
1	3	14	2	6	P=0,002
2	1	12	5	9	
3	3	11	5	2	
4	5	5	4	5	
5	8	5	0	0	
Total	20	47	16	22	

N-cadh\_i: intensidad de tinción de cadherina-N (0=ausencia, 1=débil; 2=moderada, 3=intensa)  
(N): número de casos  
Fase de evolución: 1=melanoma primario delgado, 2= melanoma primario grueso, 3=metástasis en tránsito, 4=metástasis ganglionar, 5= metástasis a distancia  
KW: Kruskal Wallis

**Figura 16. Intensidad de tinción citoplasmática frente a cadherina-N en las diferentes fases de diseminación del melanoma**

#### I.2.2.1.4. TWIST

En las metástasis a distancia se observó una menor expresión de Twist con patrón nuclear que en las metástasis ganglionares ( $p=0,027$ ). Y en las metástasis ganglionares, una mayor expresión que en las metástasis en tránsito ( $p=0,006$ ) (tabla 27). Además,



las metástasis a distancia mostraron menor expresión citoplasmática de Twist que los MM primarios ( $p=0,042$ )(tabla 28) (Fig.17).

**Tabla 27. Diferencias en la expresión nuclear de Twisist para las fases de evolución del melanoma.**

Parámetro histológico	N		Prueba		
Fase evolutiva	Twist_N		KW	MW	
	0	1		Valores	p
1	21	3	$p=0,018$	1+2 vs 5	0,197
2	24	3		1+2 vs 3	0,102
3	21	0			0,006
4	13	6		4 vs 5	0,027
5	13	0			
Total	92	12		3 vs 4	

Twist\_N: tinción nuclear para Twist (0=ausencia, 1=presencia)

Fase de evolución: 1=melanoma primario delgado, 2= melanoma primario grueso, 3=metástasis en tránsito, 4=metástasis ganglionar, 5= metástasis a distancia

KW: Kruskal Wallis  
MW: Mann Whitney

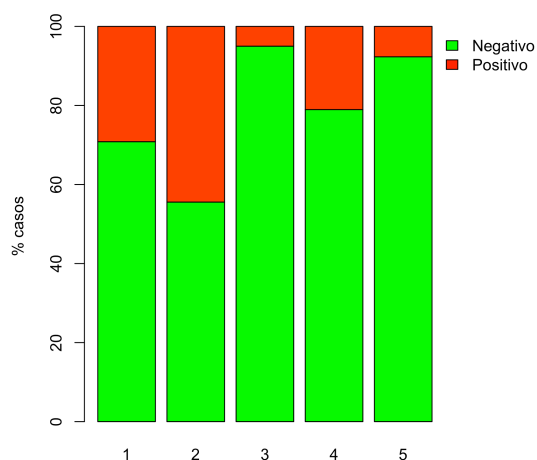
**Tabla 28. Estudio de la intensidad de inmunotinción para Twist citoplasmático en las diferentes fases de evolución**

Parámetro IHQ	Fase de evolución (valores comparados)	p	Prueba
Twist_C	1+2 vs 4	0,203	MW
	1+2 vs 5	0,042	MW

Twist\_C: tinción citoplasmática de Twist.

Fase de evolución: 1=melanoma primario delgado, 2= melanoma primario grueso, 3=metástasis en tránsito, 4=metástasis ganglionar, 5= metástasis a distancia

**Figura 17. Tinción nuclear frente a Twist en las diferentes fases de diseminación del melanoma**



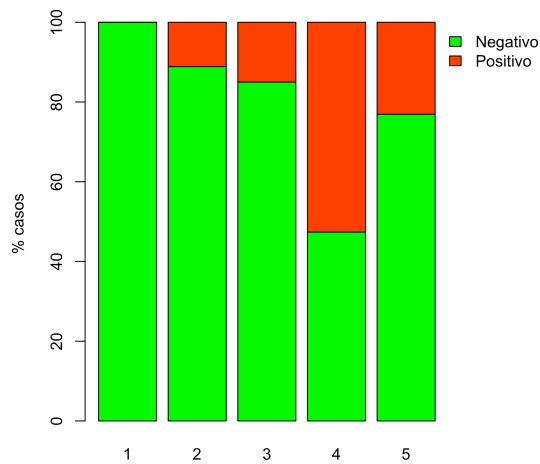
#### I.2.2.1.5. SNAIL

Se observaron diferencias en la expresión nuclear de Snail en función de la fase de evolución ( $p=0,000$ ), y concretamente, se observó mayor expresión de Snail con patrón nuclear (Snail\_N) en metástasis ganglionares que en MM primarios ( $p=0,000$ ). (Tabla 29) (Fig.18). La expresión de Snail parece aumentar selectivamente en las metástasis ganglionares.

**Tabla 29. Correlación de la expresión nuclear de Snail por inmunohistoquímica con las fases de evolución.**

Parámetro histológico	N		Prueba	
Fase de evolución	Snail_N		KW	MW
	0	1		Valores p
1	25	0	$p=0,000$	1+2 vs 4 0,000
2	24	3		
3	18	3		
4	9	10		
5	10	3		
Total	86	19		

N: número de casos  
 Snail\_N: tinción nuclear para Snail (0= negativa; 1= positiva)  
 Fase de evolución: 1=melanoma primario delgado, 2= melanoma primario grueso, 3=metástasis en tránsito, 4=metástasis ganglionar, 5= metástasis a distancia  
 KW: Kruskal Wallis  
 MN: MW: Mann Whitney

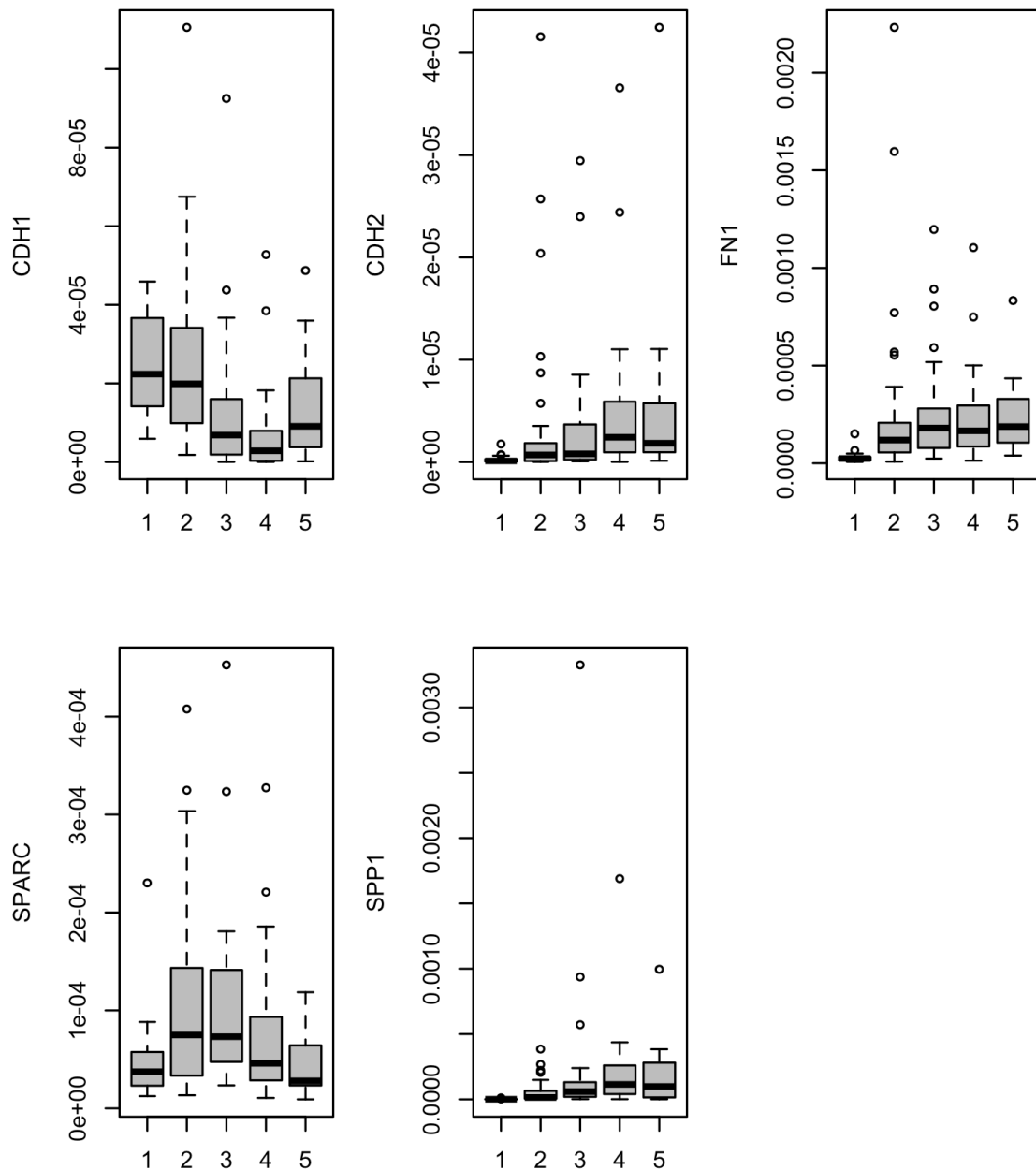
**Figura 18. Tinción nuclear de Snail en las diferentes fases de diseminación del melanoma**

Por tanto, la mayoría de los factores de EMT estudiados disminuyeron en las fases finales del proceso metastásico, es decir en las metástasis a distancia establecidas, excepto Snail, que aumenta en las metástasis ganglionares.

#### I.2.2.2. Estudio por RT-PCR:

Se observaron variaciones estadísticamente significativas en la expresión de (Fig. 19) **cadherina-E (CDH1)** ( $p<0,0001$ ), **cadherina-N (CDH2)** ( $p<0,0001$ ), **FN** ( $p<0,0001$ ), **SNAIL** ( $p<0,0001$ ), **SPP1 (OP)** ( $p<0,0001$ ), con mayor expresión en las metástasis que en los primarios. Además, **CDH2** ( $p=0,002$ ), **FN1** ( $p<0,0001$ ), **SNAI1** ( $p=0,030$ ), **SNAI2** ( $p=0,030$ ), **ON/SPARC** ( $p=0,001$ ) y **OP(SPP1)** ( $p<0,0001$ ) se expresaban en niveles superiores en los melanomas gruesos que en los melanomas delgados.

**Figura 19. Expresión de los genes CDH1, CDH2, FN1, SPARC, y SPP1 en función de la fase evolutiva del melanoma.**



Así la expresión de ARNm para los genes FN1, cadherina-E (CDH1), cadherina-N (CDH2), OP(SPP1), aumentó con la diseminación metastásica

La expresión del ARNm para osteonectina/SPARC aumentó en las fases iniciales de diseminación, y disminuyó al establecerse las metástasis ganglionares y a distancia.

Cadherina-E (CDH1) mostró mayor nivel de ARN en los estadios localizados e iniciales.

### I.2.3. Expresión de marcadores de EMT en relación con parámetros pronósticos clásicos

En las tablas 30 y 31 se muestran los resultados de la correlación entre la expresión IHQ de marcadores de EMT y los parámetros pronósticos Breslow, Nivel de Clark e índice mitótico.

**Tabla 30. Correlación entre variables IHQ de EMT cuantitativas y parámetros pronósticos clásicos.**

Variable IHQ	Prueba	Breslow	N. de Clark	Mitosis (*)
N-cadh	Correlación	0,61	0,180	0,073
	p	0,670	0,201	0,607
	N=52			
ON	Correlación	0,239	0,333	0,196
	p	0,091	0,017	0,1691
	N= 51			
FN	Correlación	0,133	0,036	0,203
	p	0,347	0,797	0,150
	N=52			
OP	Correlación	-0,003	0,257	0,155
	p	0,982	0,074	0,286
	N=49			
N: número total de casos N. de Clark: Nivel de Clark (*): número de mitosis por mm <sup>2</sup> N-cadh: cadherina-N				

**Tabla 31. Correlación entre variables IHQ cualitativas de EMT, y variables clínicas con valor pronóstico (índice de Breslow, nivel de Clark e índice mitótico)**

Variable IHQ	Valores (N)	Rango promedio (KW)					
		Breslow	p.	Clark	p.	Mitosis(*)	p
OP_i	0 (7)	18,50	0,042	17,00	0,138	18,29	0,109
	1 (38)	24,54		25,59		25,00	
	2 (4)	40,75		33,38		37,75	
	Total(49)						
FN_i	0 (14)	24,46	0,449	25,75	0,806	23,21	0,517
	1 (30)	27,18		26,73		28,05	
	2 (7)	24,43		25,07		24,21	
	3 (1)	49,00		40,00			
	Total(52)					42,00	
ON_i	1 (14)	22,54	0,524	20,14	0,153	22,29	0,531
	2 (23)	26,37		29,48		27,22	
	3 (14)	28,86		16,14		27,71	
	Total(51)						
N-cadh_c	0 (4)	19,88	0,363	19	0,282	18,50	0,261
	1 (48)	27,05		27,13		27,17	
	Total(52)						
N-cadh_i	0 (4)	15,00	0,437	8,50	0,064	8,50	0,060
	1 (26)	26,90		28,58		29,94	
	2 (7)			30,50		24,93	
	3 (15)	29,93		25,83		26,07	
	Total(52)	27,27					
Twist_N	0 (45)	25,93	0,930	26,02	0,976	25,94	0,940
	1 (6)	26,50		25,83		26,42	
	Total(51)						
Twist_C	0 (32)	24,67	0,408	24,59	0,360	23,75	0,151
	1 (19)	28,24		28,37			
	Total(51)					29,79	
Snail_N	0 (49)	25,61	0,088	25,46	0,037	25,81	0,172
	1 (3)	41,00		43,50		37,83	
	Total(52)						
Snail_C	0 (21)	24,95	0,544	22,38	0,092	24,74	0,481
	1 (21)	27,55		29,29		27,69	
	Total(52)						

(N): número de casos

OP-i: intensidad de tinción frente a OP (0=negativo, 1=débil, 2=moderado o intenso)

FN-i: Intensidad de tinción frente a Fibronectina (0=negativo, 1=débil, 2=moderado; 3= intenso)ON\_Por\_Max:

ON\_i: Intensidad de tinción frente a cadherina-N (1= negativo o débil, 2=moderado; 3= intenso)

N-Cadh-C: tinción citoplasmática con cadherina-N (0=ausencia, 1=presencia)

N-cadh\_i: Intensidad de tinción frente a cadherina-N (0=negativo, 1=débil, 2=moderado; 3= intenso)

TWIST\_N: Tinción nuclear con Twist (0=ausencia; 1=núcleos aislados; 2: &gt;10% de células)

TWIST\_C: Tinción citoplasmática con Twist (0=ausencia; 1=presencia)

SNAIL\_N: Tinción nuclear con Twist (0=ausencia; 1=presencia)

SNAIL\_C: Tinción citoplasmática con Snail (0=ausencia; 1=presencia)

En el caso de la intensidad de inmunotinción con OP, se realizó un test de Mann Withney para comparar la tinción débil (0+1) con la intensa (2), observándose un mayor índice de Breslow en los melanomas con tinción intensa ( $p=0,021$ ). También se comparó la ausencia de tinción (0) con la presencia de tinción (1+2), observándose en los tumores positivos un mayor índice de Breslow ( $p=0,014$ ).

En la tabla 32 se muestran los resultados de la correlación entre la expresión génica (por RT-PCR) de marcadores de EMT y los parámetros pronósticos clásicos: índice de Breslow, Nivel de Clark e índice mitótico.

**Tabla 32. Estudio de la expresión de genes de EMT en función de las variables pronósticas: índice de Breslow, nivel de Clark e índice mitótico. (Correlación de Pearson)**

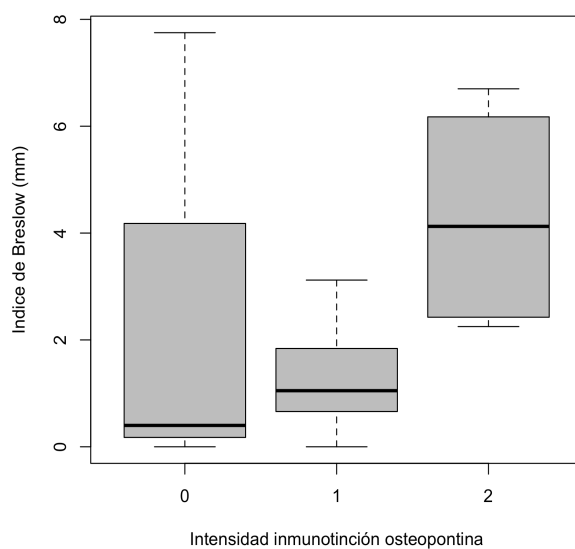
Gen	Prueba	Breslow	N. de Clark	Mitosis (*)
CDH1	Correlación	-0,177	-0,053	-0,096
	p	0,159	0,675	0,445
	N=65			
CDH2	Correlación	0,247	0,264	0,182
	p	0,048	0,034	0,148
	N=65			
FN1	Correlación	0,428	0,357	0,406
	p	0,000	0,003	0,001
	N=65			
SNAIL1	Correlación	0,260	0,296	0,280
	p	0,036	0,017	0,024
	N=65			
SNAIL2	Correlación	0,260	0,296	0,280
	p	0,036	0,017	0,024
	N=65			
ON/SPARC	Correlación	0,349	0,321	0,303
	Significación	0,004	0,009	0,014
	N=65			
SPP1(OP)	Correlación	0,405	0,287	0,277
	p	0,001	0,020	
	N=65			
TWIST1	Correlación	0,142	0,151	-0,043
	p	0,261	0,230	0,733
	N=65			
N: número total de casos				
N. de Clark: Nivel de Clark				
CDH1: gen de la cadherina E				
CDH2: gen de la cadherina N				
(*): número de mitosis por mm <sup>2</sup>				

### I.2.3.1. Índice de Breslow:

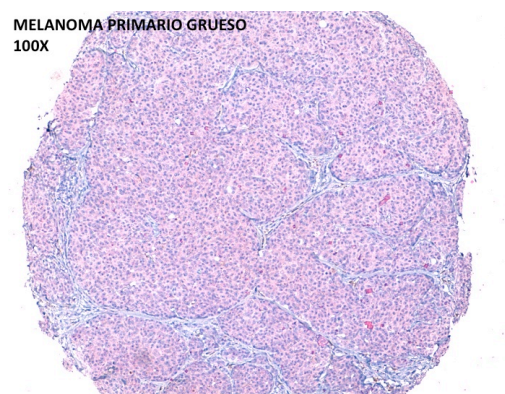
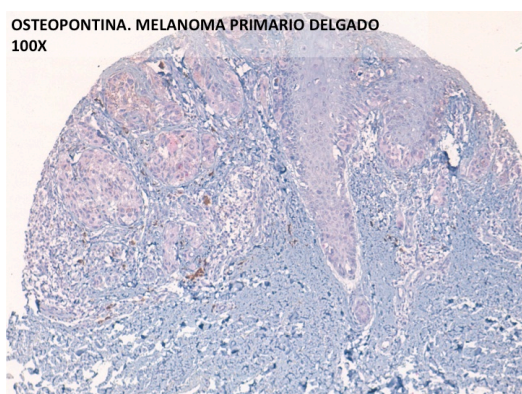
#### I.2.3.1.1 Estudio inmunohistoquímico:

Los melanomas primarios con positividad inmunohistoquímica para OP tenían un mayor índice de Breslow que los negativos ( $p=0,014$ ) (tabla 30). Además, los MP con positividad intensa para OP tenían un Breslow mayor que los que tenían expresión débil o nula ( $p=0,021$ ) (tabla 31). Por tanto, la intensidad de tinción inmunohistoquímica frente a OP se correlacionó con el índice de Breslow. (Fig. 20 y 21)

**Figura 20. Intensidad de inmunotinción frente a Osteopontina en función del Índice de Breslow.**



**Figura 21. Tinción inmunohistoquímica frente a Osteopontina en melanoma delgado (Breslow <1mm) y grueso (Breslow >= 1)**

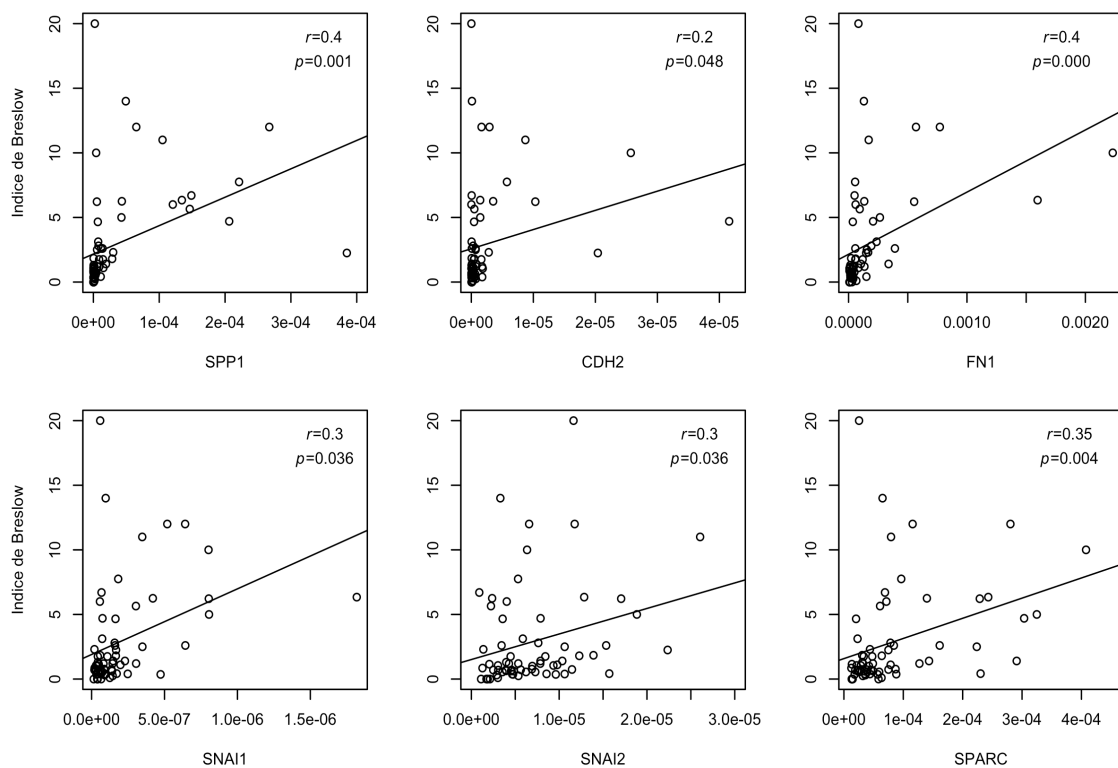




### I.2.3.1.2. Estudio por RT-PCR:

En el estudio por PCR se confirmó una correlación positiva del índice de Breslow con la expresión de ARN de SPP1 (OP) ( $p=0,001$ ), además de otros factores de EMT: CDH2 ( $p=0,048$ ), FN1 ( $p=0,000$ ), SNAIL-1 ( $p=0,036$ ), SNAIL-2 ( $p=0,036$ ), y ON/SPARC ( $p=0,004$ ). (Tabla 32)(Fig. 22).

**Figura 22. Expresión por RT-PCR de los genes SPP1, CDH2, FN1, SNAIL1, SNAIL2, SPARC, ABCB5, ABCG2 en función del Índice de Breslow**



### I.2.3.2. Ulceración

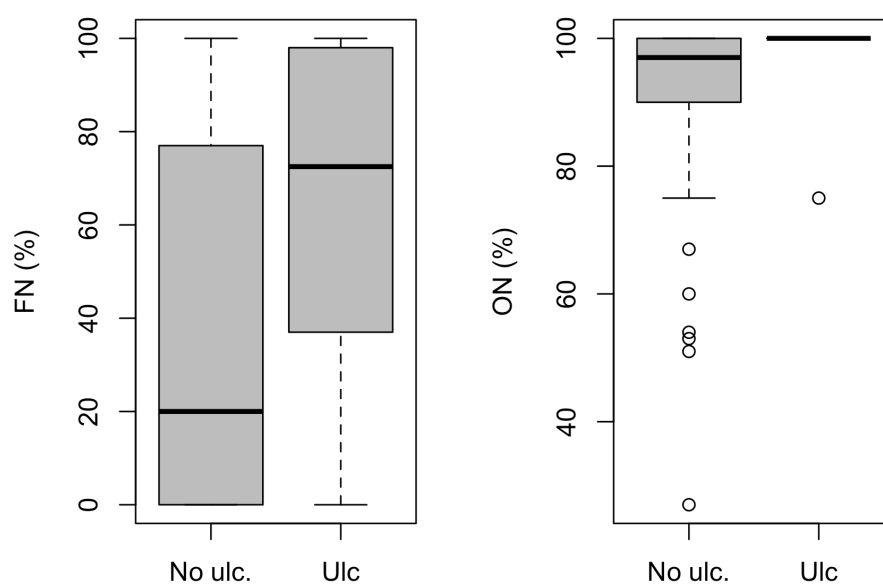
#### I.2.3.2.1 Estudio inmunohistoquímico:

Se observó que los melanomas con ulceración mostraron un mayor número de células positivas frente a **FN** ( $p=0,034$ ), y **ON/SPARC** ( $p=0,027$ ) en el estudio inmunohistoquímico (tabla 33)(Fig.23).

**Tabla 33. Variables IHQ de EMT en relación con la ulceración en melanomas primarios**

Variable IHQ	Ulceración (N)		MW
	Sí	No	
N-cadh	10	42	p=0,567
ON/SPARC	10	41	p=0,027
FN	10	42	p=0,034
OP	10	39	p=0,120

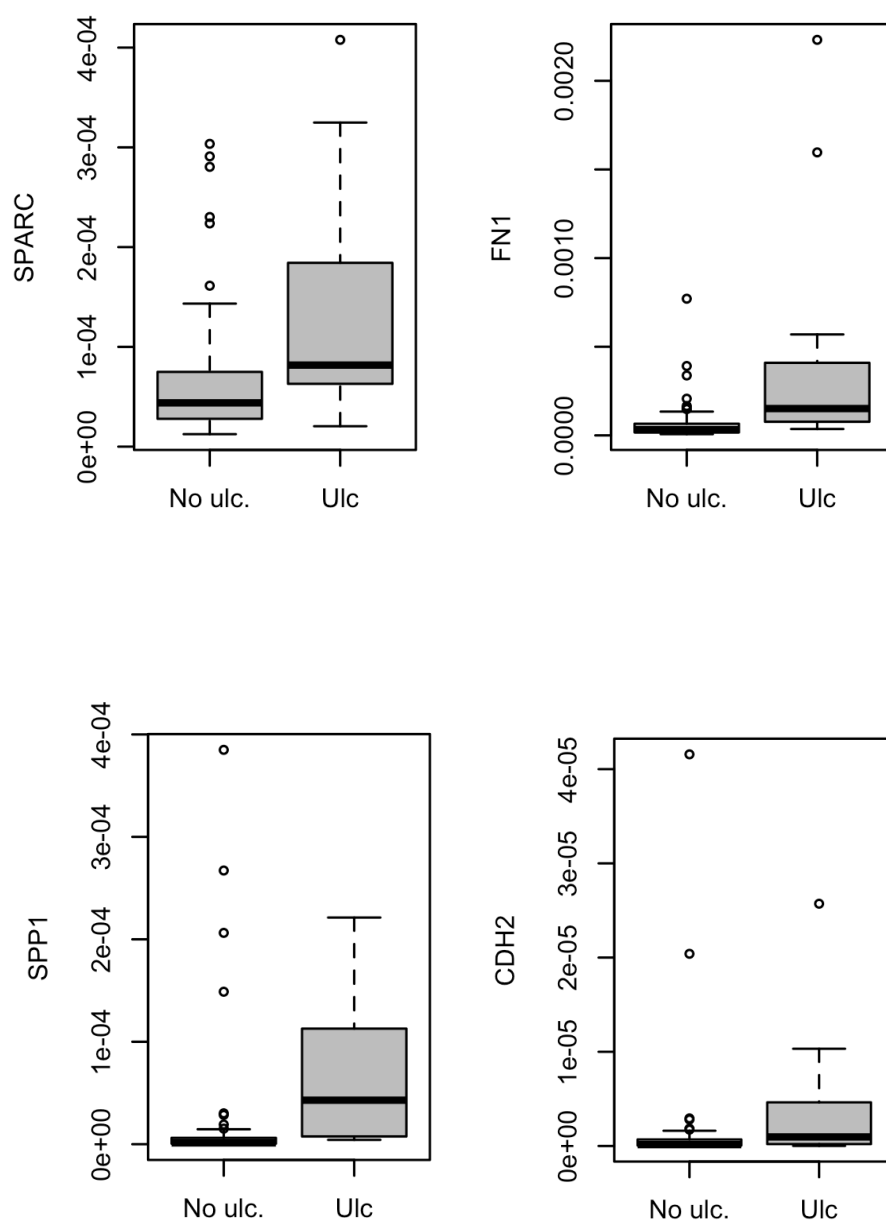
(N): número de casos  
N-cadh: Cadherina-N  
MW: Mann Withney

**Figura 23. Porcentaje de células tumorales con inmunotinción citoplasmática frente a fibronectina y osteonectina/SPARC, en función de la presencia de ulceración**

#### I.2.3.2.2. Estudio por RT-PCR

En el estudio por PCR también se observó este incremento en la expresión de ARN de los factores de EMT en los MP ulcerados de ON/SPARC (p=0,008), FN1 (p=0,000), SPP1 (OP) (p=0,000), CDH2 (cadherina-N)(p=0,028) (Fig.24)

**Figura 24. Expresión por RT-PCR de los genes de EMT (SPARC, FN1, SPP1 y CDH2 en función de la existencia de ulceración**



Por lo tanto, el aumento de expresión de ARN , en correlación con un aumento de la proteína de algunos marcadores de EMT, fundamentalmente FN1 y ON/SPARC se correlaciona con uno de los marcadores clásicos de mal pronóstico, la ulceración. El

aumento de expresión de ARN de SPP1 y CDH2 no se traduce en un incremento de la proteína en el estudio inmunohistoquímico.

### I.3. MARCADORES DE CÉLULA MADRE CANCEROSA Y PROGRESIÓN TUMORAL

#### I.3.1. Fase de crecimiento tumoral

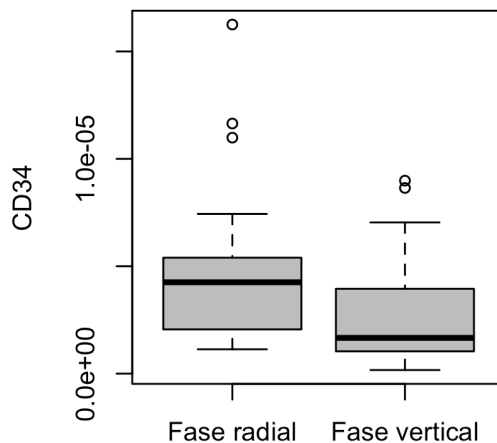
##### I.3.1.1. Estudio inmunohistoquímico

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el estudio inmunohistoquímico para ninguno de los marcadores estudiados.

##### I.3.1.2. Estudio por RT-PCR

El CD34 se expresaba en menor medida en los melanomas en fase de crecimiento vertical, que en los melanomas en fase de crecimiento radial ( $p=0,007$ ) (Fig. 25)

**Figura 25. Expresión de ARNm de CD34 en función de la fase de crecimiento (radial o vertical) de los melanomas primarios**



### I.3.2. Relación con la fase evolutiva del espectro de progresión tumoral: melanoma primario delgado, melanoma primario grueso, metástasis en tránsito, metástasis ganglionar, metástasis a distancia.

#### I.3.2.1. Estudio con técnicas inmunohistoquímicas

La tabla 34 muestra las correlaciones estadísticamente significativas entre la expresión inmunohistoquímica de los marcadores de CMC, y las fase evolutivas.

**Tabla 34. Correlación entre los parámetros IHQ de CMC cuantitativos, y las fases evolutivas.**

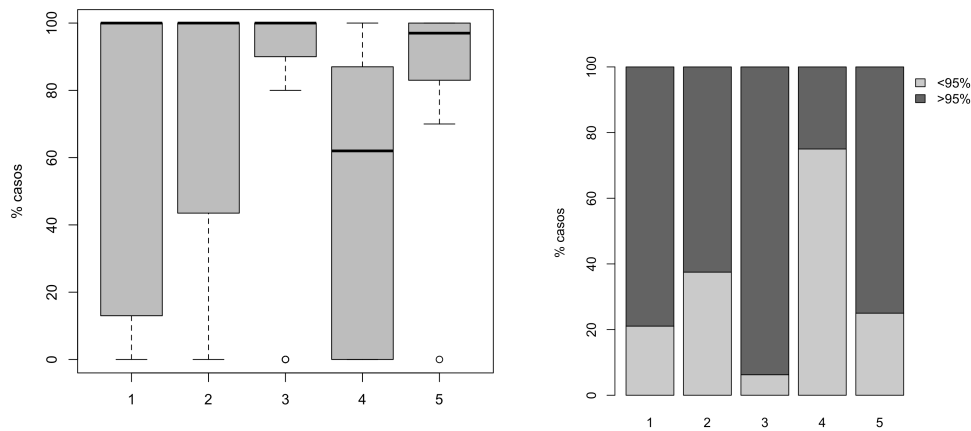
Parámetro IHQ	Tipo	N	KW	Mann-Whitney	
				Parámetro	p
CD133	1	24	p=0,014	3 vs 4	0,002
	2	27		4 vs 5	0,006
	3	21		1+2 vs 4	0,036
	4	19			
	5	13			
	Total	104			
ABCB5	1	25	p=0,004	3 vs 4	0,018
	2	27		1+2 vs 5	0,002
	3	21		4 vs 5	0,171
	4	19		3 vs 5	0,001
	5	13			
	Total	105			

N: número total de casos  
KW: Kruskal Wallis  
MW: Mann Whitney

##### I.3.2.1.1. CD133:

El porcentaje de células positivas frente a CD133 fue mayor en los melanomas primarios (p=0,036), en las metástasis en tránsito (p=0,002) y en las metástasis a distancia (p=0,006) que en las metástasis ganglionares. (Fig.26). La expresión de CD133 disminuyó en la diseminación ganglionar.

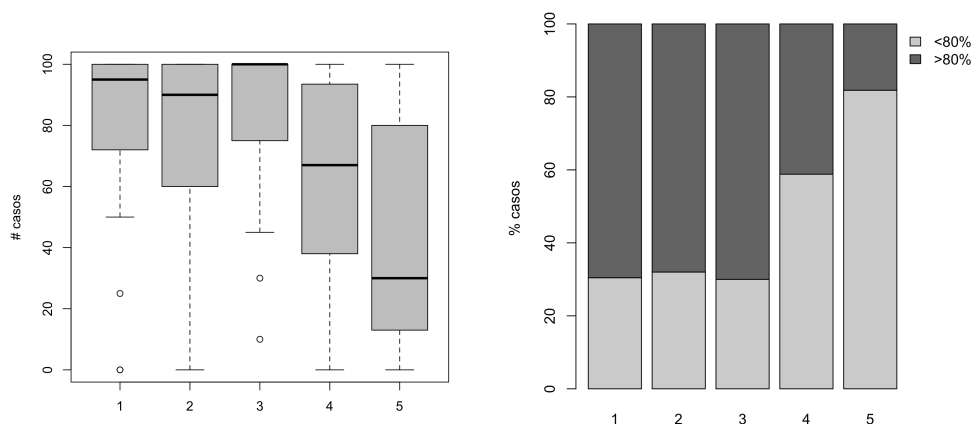
**Figura 26. Porcentaje de células con inmunopositividad frente a CD133 en las diferentes fases de diseminación.**



#### I.3.2.1.2. ABCB5:

El porcentaje de células positivas frente a **ABCB5** fue mayor en las metástasis en tránsito que en las metástasis ganglionares ( $p=0,018$ ) y que en las metástasis a distancia ( $p=0,001$ ); y mayor en los melanomas primarios que en las metástasis a distancia ( $p=0,002$ ). Por lo tanto, la expresión de ABCB5 aumentó en las fases iniciales de diseminación (MT) y disminuyó al alcanzar fases más avanzadas (MG y MD)(Fig. 27).

**Figura 27. Porcentaje de células con tinción citoplasmática frente a ABCB5 en las diferentes fases de diseminación del melanoma.**



### I.3.2.1.3. CD34

Se observó que los melanomas primarios (delgados y gruesos) tenían un mayor porcentaje de células con **expresión citoplasmática** de CD34 que las metástasis (Mann Whitney,  $p=0,04$ ). No se observó ninguna diferencia al estudiarlos en función de la **vascularización**.

En las tablas cruzadas (Chi cuadrado) se observó que los melanomas con tinción del **estroma extratumoral** con CD34, son mayoritariamente (81,6%) primarios. No se encontró ninguna diferencia significativa con la tinción del estroma intratumoral. Por el contrario el 84% de los tumores primarios no mostraron ninguna positividad **nuclear** frente a CD34, y de todos los tumores estudiados con tinción nuclear, el 63% eran metástasis.

Por tanto, los melanomas primarios mostraron una mayor expresión citoplasmática de CD34 en las células tumorales, así como en las del estroma extratumoral, que las metástasis. Por el contrario, la tinción nuclear de CD34 en las células tumorales fue más frecuente en las metástasis.

### I.3.2.2. Estudio por PCR:

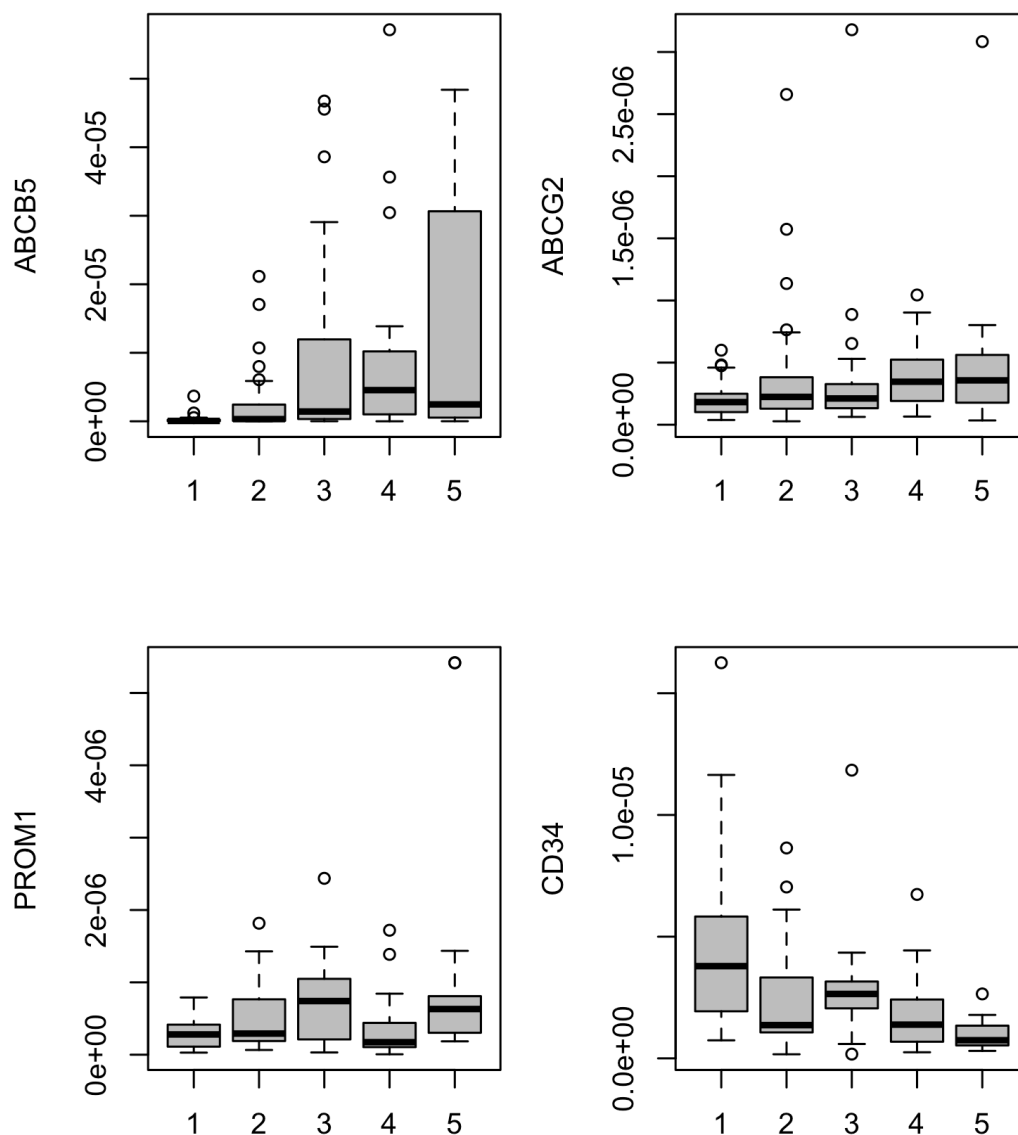
Se observaron variaciones estadísticamente significativas en la expresión de los **marcadores de célula madre ABCB5** ( $p=0,000$ ), **ABCG2** ( $p=0,005$ ), **CD34** ( $p=0,000$ ), y **CD133** ( $p=0,000$ ) (Fig.28)

Casi todos se expresaron progresivamente más al aumentar el grado de progresión tumoral, a excepción de CD34, que se expresó más en melanomas primarios que en los metastásicos.

El CD133 disminuyó en las MG, con respecto a las MT.

Así pues, la expresión de ARN para los genes ABCB5, ABCG2 aumentó con la progresión tumoral. La expresión del ARNm para CD133 disminuyó en las metástasis ganglionares. CD34 se expresó en mayor medida en MP, y particularmente en los MP delgados que en metástasis.

**Figura 28. Expresión por RT-PCR de marcadores de CMC (ABCB5, ABCG2, PROM1 Y CD34) en las diferentes fases de diseminación del melanoma.**



### I.3.3. Expresión de marcadores de célula madre tumoral en relación con parámetros pronósticos clásicos

Las tablas 35, 36 y 37 muestran las correlaciones entre la expresión de marcadores de CMC y las variables histopatológicas y clínicas continuas.



**Tabla 35. Correlación entre variables IHQ cuantitativas de CMC y variables con valor pronóstico: índice de Breslow, nivel de Clark e índice mitótico. (Correlación de Pearson)**

Variable IHQ	Prueba	Breslow	N. de Clark	Mitosis (*)
CD133	Correlación de Pearson	0,118	0,101	-0,21
	P	0,411	0,482	0,886
	N=51			
ABCB5	Correlación de Pearson	0,102	0,161	0,101
	P	0,470	0,256	0,476
	N=52			

N: número total de casos  
 N. de Clark: Nivel de Clark  
 (\*): número de mitosis por mm<sup>2</sup>  
 N-cadh: cadherina-N

**Tabla 36. Correlación entre variables IHQ cualitativas de CMC y variables con valor pronóstico: índice de Breslow, nivel de Clark e índice mitótico.**

Variable IHQ	Valores	N	KW		
			Breslow	Clark	Mitosis(*)
CD133_i	0	8	P=0,200	P=0,508	P=0,554
	1	20			
	2	14			
	3	9			
	Total	51			
ABCB5_i	0	4	P=0,071	P=0,017	P=0,107
	1	28			
	2	19			
	3	1			
	Total	52			

N: número de casos  
 CD133\_i: Intensidad de tinción frente a CD133 (0=negativo, 1=débil, 2=moderado; 3= intenso)  
 ABCB5\_i: Intensidad de tinción frente a ABCB5 (0=negativo, 1=débil, 2=moderado; 3= intenso)

**Tabla 37. Correlación entre la expresión de ARNm de marcadores de CMC y variables con valor pronóstico: índice de Breslow, nivel de Clark e índice mitótico**

Variable PCR	Correlación de Pearson	Breslow	N. de Clark	Mitosis (*)	edad
ABCB1	Correlación p N=65	-0,50 0,690	-0,15 0,908	-0,40 0,749	0,119 0,344
ABCB5	Correlación p N=65	-0,075 0,552	-0,033 0,796	-0,090 0,477	-0,079 0,533
ABCG2	Correlación p N=51	0,252 0,043	0,316 0,010	-0,210 0,886	0,165 0,094
CD34	Correlación p N=65	-0,315 0,011	-0,271 0,029	-0,264 0,033	0,073 0,561
PROM1(CD133)	Correlación p N=65	0,272 0,028	0,379 0,002	0,294 0,017	0,401 0,001

N: número total de casos  
N. de Clark: Nivel de Clark

(\*): número de mitosis por mm<sup>2</sup>

### I.3.3.1. Relación con el índice de Breslow

#### I.3.3.1.1 Estudio inmunohistoquímico

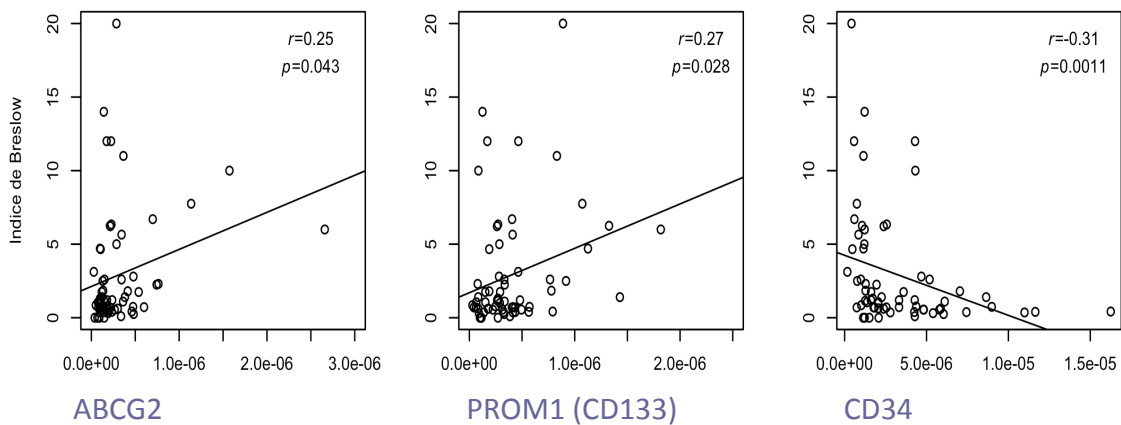
La tinción **nuclear** de CD34 se asoció a un mayor índice de Breslow (p=0,005)

Por el contrario, la tinción del **estroma extratumoral** se asoció a un índice de Breslow más bajo (p=0,000). El resto de parámetros inmunohistoquímicos no mostraron diferencias estadísticamente significativas (tablas 35y 36).

### I.3.3.1.2 Estudio por RT-PCR

En el estudio por PCR se confirmó una correlación positiva del índice de Breslow con la expresión de ARN de los siguientes marcadores de célula madre cancerosa: ABCG2 ( $p=0,043$ ), PROM-1 (CD133) ( $p=0,028$ ); y una correlación negativa con CD34 ( $p=0,011$ ). (tabla 37) (Fig. 29)

**Figura 29. Expresión del ARNm de ABCG2, PROM 1(CD133) Y CD34 en función del índice de Breslow.**



### I.3.3.2. Relación con la ulceración:

#### I.3.3.2.1 Estudio inmunohistoquímico

La tinción **nuclear** frente a CD34 se asoció con la ulceración ( $p=0,000$ ). El 70% de los melanomas ulcerados mostraban positividad nuclear con CD34, y el 87,5 % de los melanomas primarios con tinción nuclear estaban ulcerados.

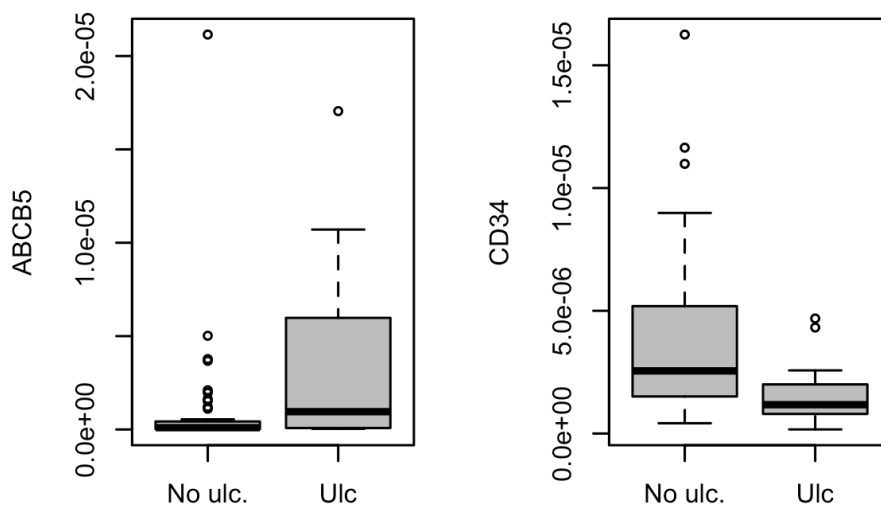
La tinción del **estroma extratumoral** con CD34 también se relacionó con la ulceración, pero en el sentido opuesto, ya que el 92,5% de los tumores con tinción estromal extratumoral no estaban ulcerados. Por otro lado, se observó que todos los tumores ulcerados mostraban negatividad del estroma intratumoral frente a CD34.

### I.3.3.1.2 Estudio por RT-PCR

En el estudio por PCR también se observó un incremento en la expresión de ARN del marcador de célula madre tumoral ABCB5 ( $p=0,008$ ).

Destacó sin embargo una mayor expresión de CD34 en los MP no ulcerados ( $p=0,001$ ). (Fig. 30)

**Figura 30. Expresión del ARNm de ABCB5 y CD34 en función de la presencia de ulceración en los melanomas primarios.**



### I.3.3.3. Relación con el índice mitótico:

#### I.3.3.3.1 Estudio inmunohistoquímico

La tinción **nuclear** de CD34 se asoció a un mayor número de mitosis ( $p=0,006$ )

Por el contrario, la tinción del **estroma extratumoral** se asoció a un número de mitosis más bajo ( $p=0,002$ ). El resto de parámetros inmunohistoquímicos no mostraron diferencias estadísticamente significativas

#### **I.3.3.3.2 Estudio por RT-PCR**

No se observó correlación estadísticamente significativa entre el número de mitosis y las variables de expresión génica estudiadas.

## I.4. PERFILES DE EXPRESIÓN DE MARCADORES DE EMT Y CÉLULA MADRE TUMORAL

### I.4.1. Metástasis versus melanomas primarios:

En primer lugar, se comparó el perfil de las metástasis con respecto a los melanomas primarios, para identificar factores diferenciales.

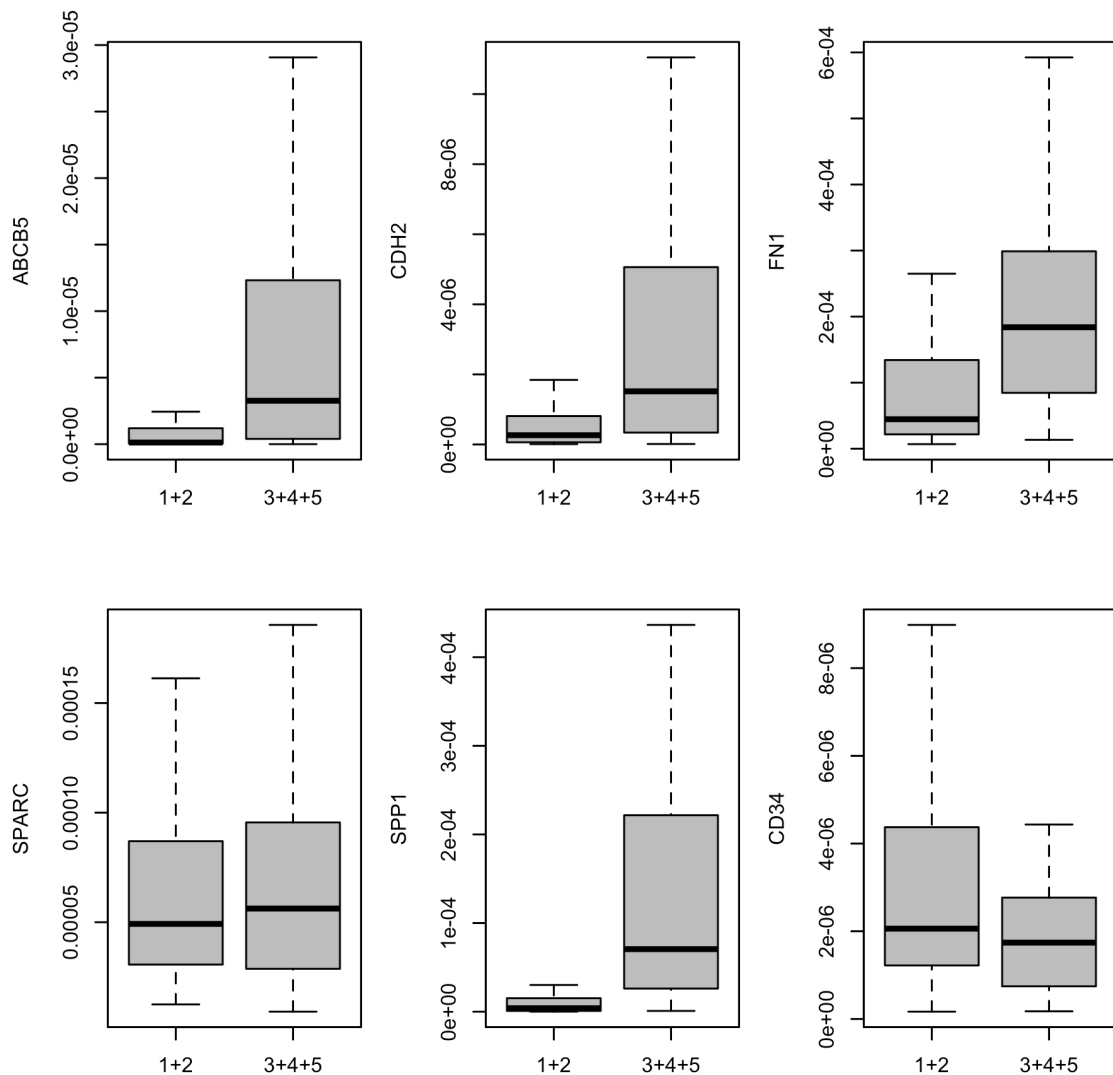
#### I.4.1.1. Resultados en estudio por PCR:

En las **metástasis**, comparado con los melanomas primarios, se observó una mayor expresión de:

- marcadores de célula madre: **ABCB5 (p=0,001)**
- marcadores de EMT: **cadherina-N (CDH2)(p=0,010)**, **fibronectina 1 (p=0,000)**, **osteonectina/SPARC (p=0,003)** y **osteopontina (p=0,000)**. (Fig. 31)

Por otro lado, se observó una mayor expresión de CD34 en los melanomas primarios que en las metástasis. (Fig. 31)

**Figura 31. Comparación de la expresión de genes de EMT (CDH2, FN1, SPARC, SPP1) Y CMC (ABCB5, CD34) por RT-PCR en melanomas primarios y metástasis**



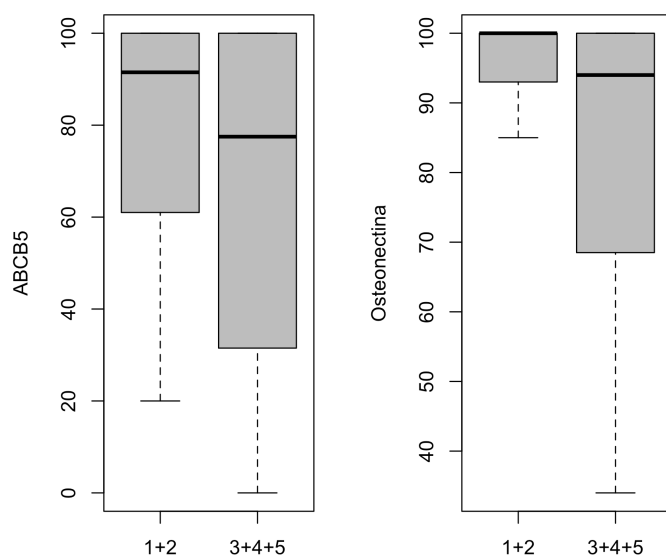
#### I.4.1.2. Resultados en el estudio inmunohistoquímico:

Como se ha comentado anteriormente, la **tinción nuclear frente a CD34** es mayor en metástasis de melanoma que en melanomas primarios

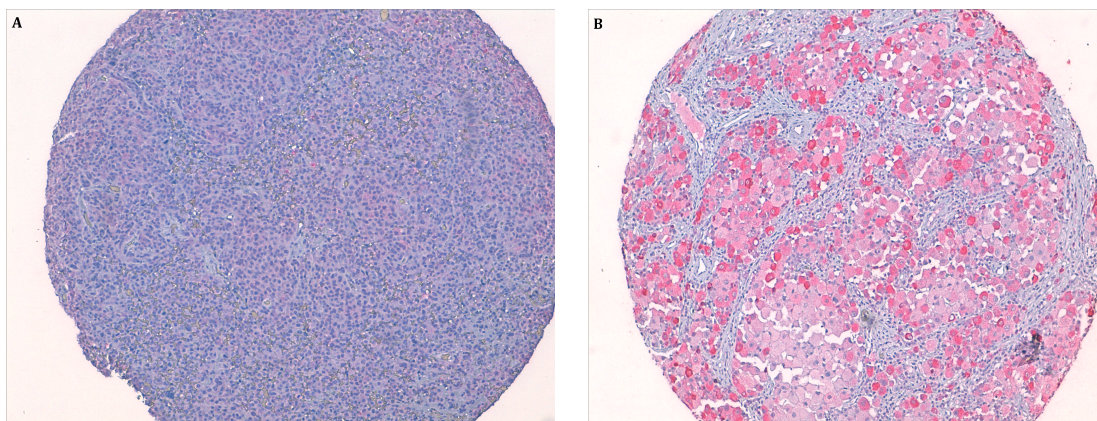
Sin embargo, se observó una menor inmunotinción en las metástasis que en los primarios, en el estudio inmunohistoquímico, de:

- cadherina N citoplasmática** (en cuanto al porcentaje de células positivas)
- osteonectina/SPARC** (en cuanto al porcentaje de células positivas) (Fig.32)
- osteopontina** (en cuanto a la intensidad de tinción)
- ABCB5** (en cuanto al porcentaje de células positivas)(Fig. 32 y 33)
- CD34 citoplasmático**

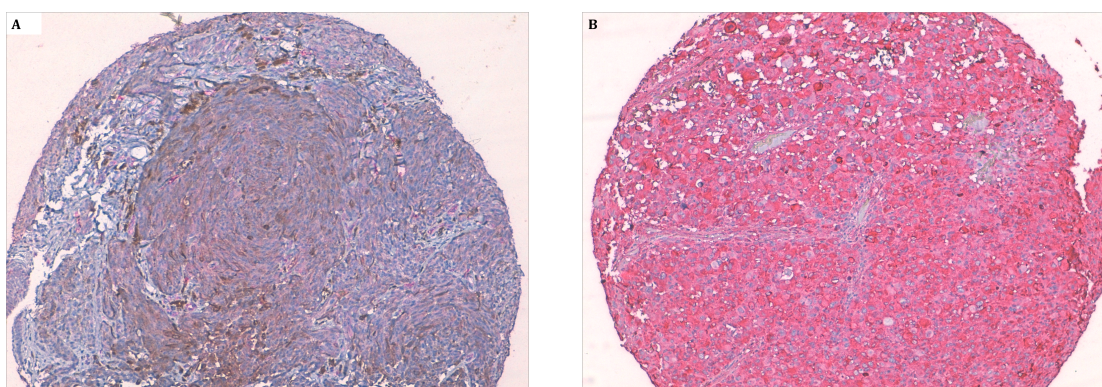
**Figura 32. Expresión inmunohistoquímica e ABCB5 y osteonectina/SPARC en tumores primarios y metástasis**



**Figura 33. Inmunotinción para ABCB5 en tumor primario (A) y metástasis (B) (100x)**



**Figura 34. Inmunotinción para ON en melanomas primarios (A) y metastásicos (B) (100x)**





#### I.4.2. Metástasis versus melanomas primarios que cursan con metástasis:

En segundo lugar, se comparó el perfil de expresión de las metástasis únicamente con los melanomas primarios que cursaron posteriormente con metástasis a distancia, observándose con significación estadística que las metástasis presentaron una mayor expresión de ARNm de ABCB5 ( $p=0,015$ ) y una menor expresión de CDH1 ( $p=0,005$ ).

#### I.4.3. Melanomas primarios no metastáticos versus melanomas primarios metastáticos:

##### I.4.3.1. Estudio de expresión de ARN por PCR

##### I.4.3.1.1. Metástasis a distancia

En segundo lugar, se compararon los melanomas primarios que a lo largo de su curso evolutivo dieron metástasis a distancia con aquellos sin metástasis asociadas (Tabla 38), observándose por PCR un aumento de expresión de ARNm en los que las desarrollaron de:

-factores de EMT: FN1( $p=0,006$ ), OP(SPP1) ( $p<0,0001$ ) (Fig. 36)

-marcadores de célula madre: ABCG2 (0,007).(Fig. 35)

Por el contrario, se observó una mayor expresión de **CD34** en aquellos melanomas no metastáticos ( $p=0,002$ ). (Fig. 36)

**Tabla 38. Marcadores de EMT y CMC con correlación significativa con el desarrollo de metástasis a distancia**

Variable	Metástasis a distancia	n	rango	MW (p)
FN1	no	49	29,29	0,006
	sí	16	44,38	
	total	65		
OP (SPP1)	no	49	27,22	<0,0001
	sí	16	50,69	
	total	65		
ABCG2	no	49	29,39	0,007
	sí	16	44,06	
	total	65		
CD34	no	49	37,18	0,002
	sí	16	20,19	
	total	65		

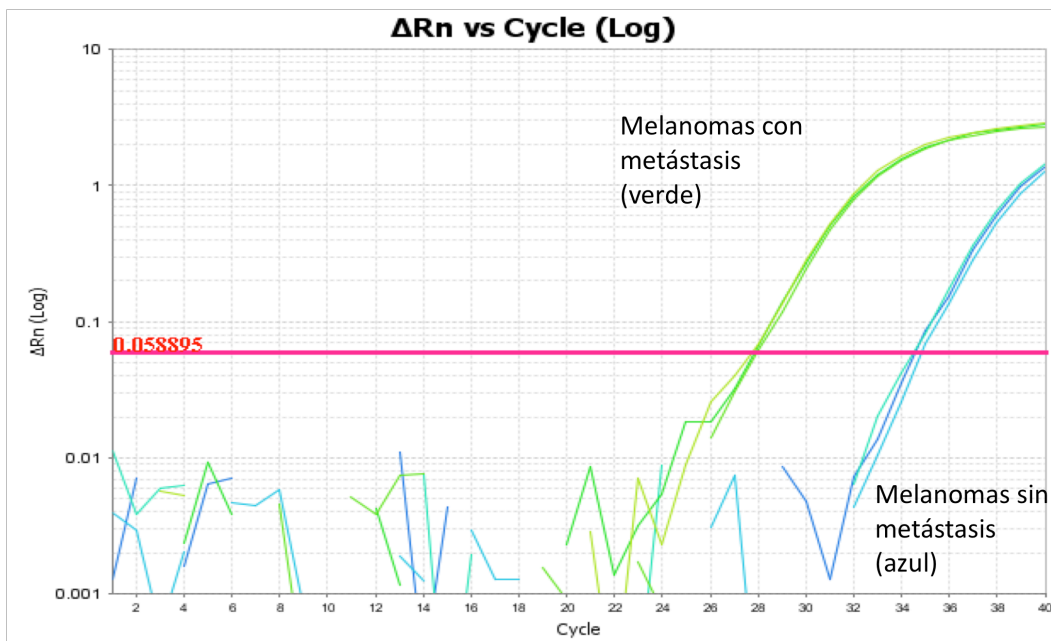
#### I.4.3.1.2. Metástasis ganglionares

Se observó una mayor expresión en los melanomas con metástasis ganglionares de:

-factores de EMT: **FN1** ( $p < 0,0001$ ), **ON/SPARC** ( $p = 0,012$ ), **OP(SPP1)** ( $p = 0,002$ )

-marcadores de célula madre: **ABCB5** ( $p = 0,025$ ), **ABCG2** ( $p = 0,018$ ).

**Figura 35.-Amplificación de la expresión de ABCB5 en melanomas primarios con y sin metástasis a distancia**



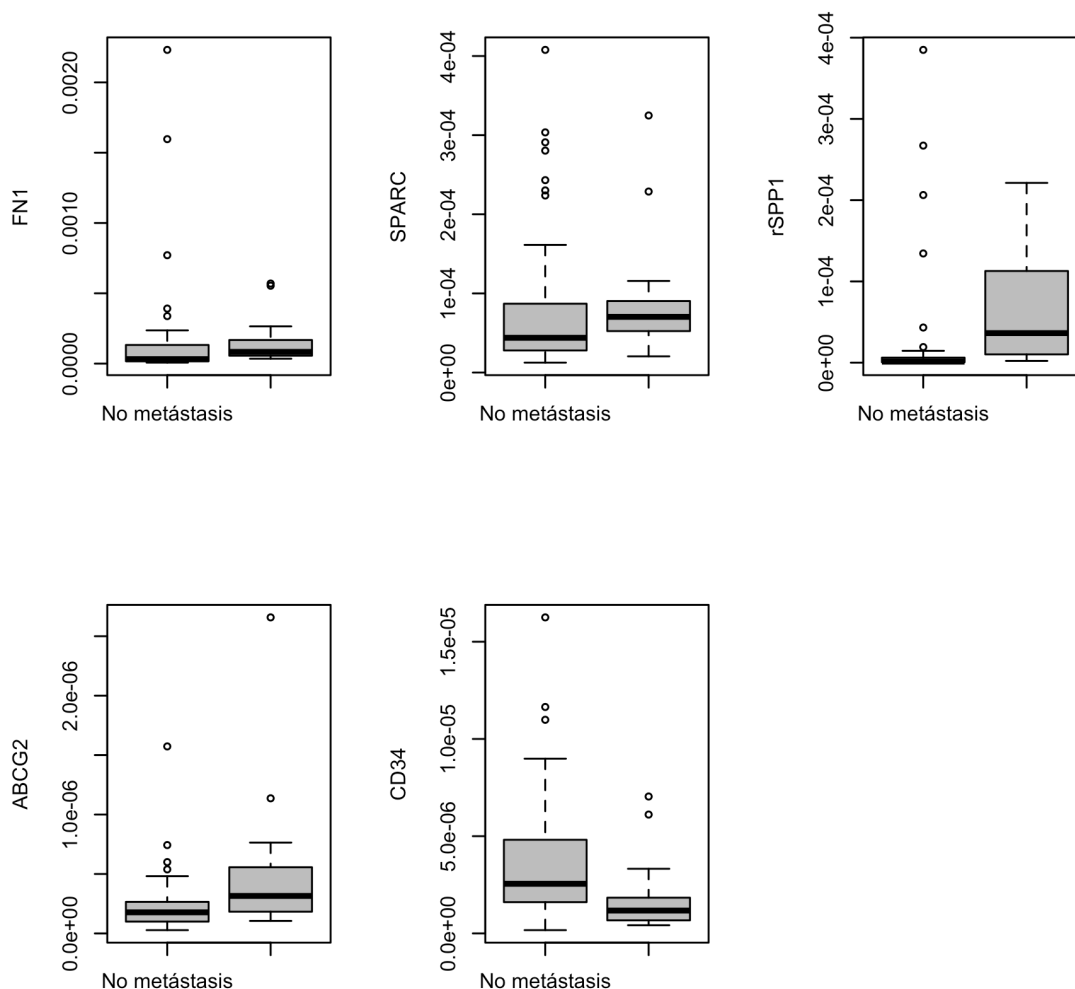
#### I.4.3.1.3. Metástasis en tránsito

Se observó una mayor expresión de ARN en los melanomas con metástasis en tránsito para los genes:

-factores de EMT: **FN1** ( $p = 0,016$ ), **ON/SPP1** ( $p = 0,017$ )

-marcadores de célula madre: **ABCB5** ( $p = 0,027$ ), **ABCG2** ( $p = 0,026$ )

**Figura 36. Expresión de los genes FN1, SPARC, SPP1, ABCG2 Y CD34 en melanomas primarios con y sin metástasis**



#### **I.4.3.2. Resultados del estudio inmunohistoquímico, en melanomas que dieron metástasis:**

##### **I.4.3.2.1. Metástasis ganglionares**

Los melanomas que dieron metástasis ganglionar en su curso evolutivo mostraron una mayor expresión inmunohistoquímica de los marcadores de EMT: **OP** ( $p=0,029$ ) y **ON** ( $p=0,031$ ) (Tabla 39). No se observaron correlaciones estadísticamente significativas entre el desarrollo de metástasis y la expresión inmunohistoquímica de marcadores de CMC (Tabla 40)

**Tabla 39. Correlación entre la expresión IHQ de marcadores de EMT y desarrollo de metástasis ganglionares**

Variable IHQ	Metástasis ganglionares (N)		MW
	No	Sí	
N-cadh	44	8	p=0,762
ON	43	8	p=0,031
FN	44	8	p=0,522
OP	41	8	p=0,029

(N): número de casos

N-cadh: Cadherina-N

MW: Mann Whitney

**Tabla 40. Correlación entre la expresión IHQ de marcadores de CMC y desarrollo de metástasis ganglionares**

Variable IHQ	Metástasis ganglionar (N)		MW
	No	Sí	
CD133	43	8	p=0,361
ABCB5	44	8	P=0,102

(N): número de casos

MW: Mann Whitney

#### I.4.3.2.2. Metástasis a distancia

Los melanomas con metástasis a distancia en su curso evolutivo mostraron una mayor expresión inmunohistoquímica de **ON/SPARC** (p=0,017) (Fig. 37) (Tabla 41)

Los MM con positividad intensa frente a **OP** dieron más frecuentemente **metástasis a distancia** que los negativos (p=0,23) (Tabla 43)

En el estudio de intensidad de tinción frente a **CD133**, los MM negativos no mostraron en ningún caso metástasis ganglionar a distancia (p=0,053), ni metástasis a distancia (p=0,007) (Fig. 38 y 39)(tabla 42).

Se estudiaron las diferencias entre los melanomas que dieron metástasis en su curso evolutivo y aquellos que no las desarrollaron, para la expresión de **CD34**:

En las pruebas no paramétricas, (prueba de Mann-Whitney) para la tinción **citoplasmática y la vascularización** no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En las tablas cruzadas para la **tinción nuclear** se observó una diferencia con significación estadística ( $p < 0,0001$ ). Los melanomas sin tinción nuclear dan metástasis con menos frecuencia (16,6%) que los positivos (75%) (Fig. 40). No se encontraron diferencias significativas para la tinción del estroma, ni intratumoral ni extratumoral

**Tabla 41. Correlación entre la expresión IHQ de marcadores de EMT y desarrollo de metástasis a distancia**

Variable IHQ	Metástasis a distancia (N)		MW
	No	Sí	
N-cadh	40	12	p=0,416
ON/SPARC	39	12	p=0,017
FN	40	12	p=0,411
OP	37	12	p=0,333

N: número de casos  
N-cadh: Cadherina-N  
MW: Mann Whitney

**Tabla 42. Correlación entre la expresión IHQ de marcadores de CMC y desarrollo de metástasis a distancia**

Variable IHQ	Metástasis a distancia (N)		MW
	No	Sí	
CD133	39	12	p=0,162
ABCB5	40	12	p=0,325

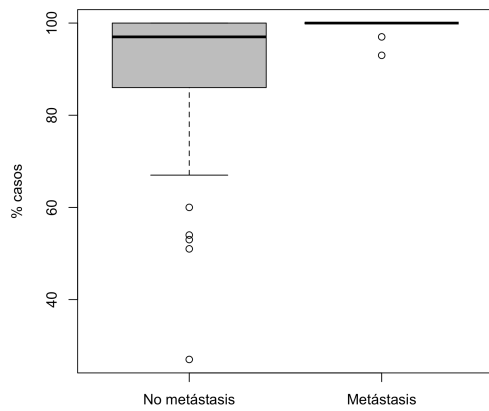
N: número de casos  
MW: Mann Whitney

**Tabla 43. Correlación entre variables IHQ cualitativas y desarrollo de metástasis a distancia**

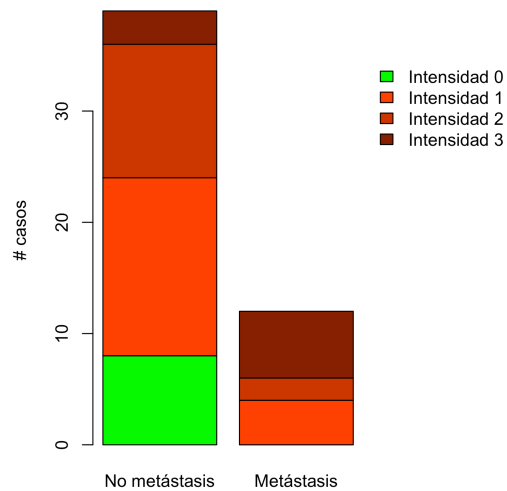
Parámetro clínico		Parámetro IHQ (N)							
Parámetro clínico		OP_i			CD133_i				
		0	1	2	0	1	2	3	
Metástasis a distancia	No	5	31	1	8	16	12	3	
	Sí	2	7	3	0	4	2	6	
	Total	7	38	4	8	20	14	9	
Pearson		p=0,042				P=0,007			
KW		0 vs 2 (p=0,23)				0 vs 3 (p=0,009)			

(N): número de casos  
OP-i: intensidad de tinción frente a OP (0=negativo, 1=débil, 2=moderado o intenso)  
CD133\_i: Intensidad de tinción frente a CD133 (0=negativo, 1=débil, 2=moderado; 3= intenso)  
KW: Kruskal Wallis

**Figura 37. Porcentaje de células positivas frente a osteonectina/SPARC en melanomas primarios con y sin metástasis**

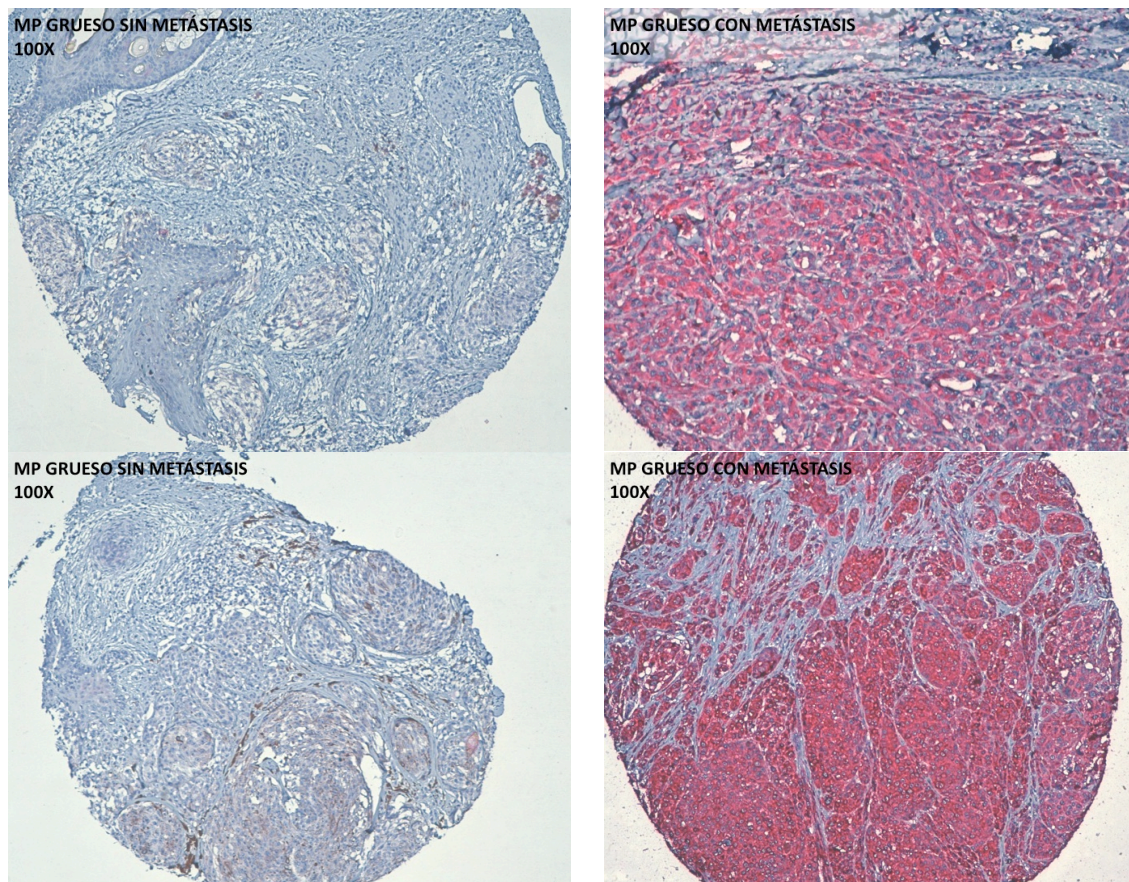


**Figura 38. Intensidad de inmunotinción frente a CD133 en melanomas primarios que dan metástasis en su evolución frente a melanomas primarios que no las dan**

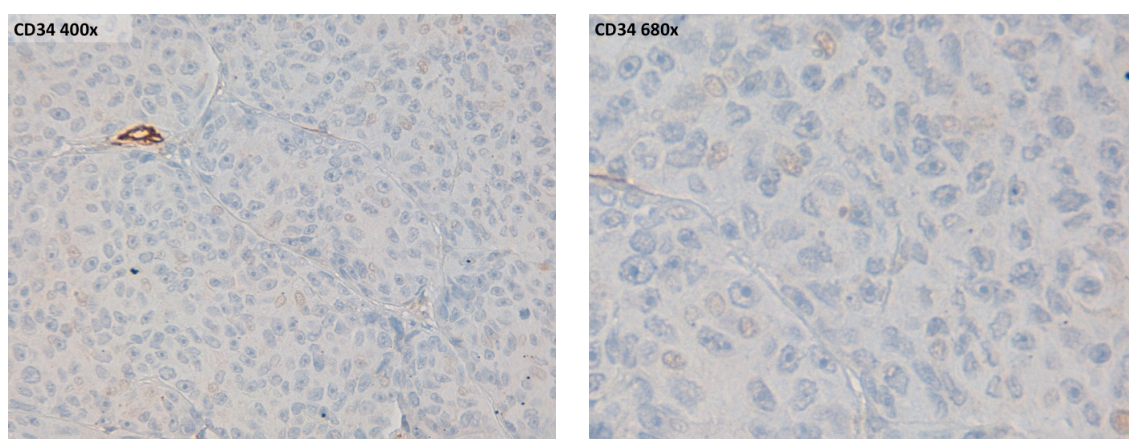




**Figura 39. Tinción inmunohistoquímica para CD133 en melanomas primarios sin metástasis a distancia y con metástasis a distancia.**



**Figura 40. Inmunotinción nuclear para CD34 en melanoma primario con metástasis**



### Desglosando las metástasis en función de su localización, se observó que:

Los melanomas que dieron metástasis hepáticas mostraron una mayor expresión de ARN por PCR de osteopontina (**SPP1**). En el estudio inmunohistoquímico, todos los melanomas con metástasis hepáticas fueron positivos para **OP** (OP<sub>i</sub>=1 o 2), además de mostrar mayor expresión de **FN** (p=0,031)(Tabla 44).

**Tabla 44. Expresión de marcadores de EMT y CMC en el estudio IHQ y RT-PCR, en relación con la localización de las metástasis a distancia**

Localización	Variable	Método de estudio	P	Prueba estadística
Hígado	OP (SPP1)	RT-PCR	0,030	MW
	OP <sub>i</sub>	IHQ	0,001	Chi cuadrado de Pearson
	FN	IHQ	0,031	MW
Piel	CDH2	RT-PCR	0,021	MW
Cerebro	ABCG2	RT-PCR	0,014	MW
	CDH1	RT-PCR	0,016	MW
	CD133 (PROM1)	RT-PCR	0,039	MW
	OP (SPP1)	RT-PCR	0,026	MW
Hueso	CDH1	RT-PCR	0,038	MW
Pulmón	ABCG2	RT-PCR	0,007	MW
	FN1	RT-PCR	0,005	MW
	OP(SPP1)	RT-PCR	0,001	MW
	TWIST1	RT-PCR	0,013	MW

OP<sub>i</sub>: OP-i: intensidad de tinción frente a OP  
 CDH1: gen de la cadherina-E (CDH1)  
 CDH2: gen de la cadherina-N (CDH2)

Los MP con metástasis cutánea a distancia durante su curso evolutivo mostraron una mayor expresión de cadherina-N (**CDH2**).

Los melanomas que dieron metástasis óseas mostraron una mayor expresión de ARN por PCR De CDH1 (p=0,038)

EN los MP que dieron metástasis cerebrales en su curso evolutivo, se observó con significación estadística, una mayor expresión de ARNm de los marcadores de CMC: **ABCG2, y PROM1 (CD133)**, y de marcadores de EMT: **cadherina E (CDH1) y SPP1**. En los melanomas con metástasis pulmonares, los marcadores que se expresaban en rango superior con significación estadística fueron **ABCG2, FN1, OP (SPP1) y TWIST**.



## I.5. ESTUDIO DE INTERVALO LIBRE DE METÁSTASIS A DISTANCIA Y DE SUPERVIVENCIA:

### I.5.1. Intervalo libre de metástasis a distancia (en variables por PCR)

Se observó una clara disminución, estadísticamente significativa, del tiempo libre de metástasis a distancia en los melanomas primarios con mayor expresión por PCR de ARN de ABCG2 ( $p=0,008$ )(Fig. 41)

Por el contrario, aumentó el tiempo libre de metástasis en los que expresaban CD34 ( $p=0,007$ ) (Fig. 42)

Por lo tanto, la expresión de ARN mensajero de ABCG2 se correlacionó con un menor intervalo libre de metástasis a distancia. Por el contrario, la expresión de CD34 se asoció a un intervalo libre de metástasis más largo.

Figura 41. Periodo libre de metástasis a distancia en función de la expresión de ABCG2 por PCR (en verde los melanomas que expresan ABCG2)

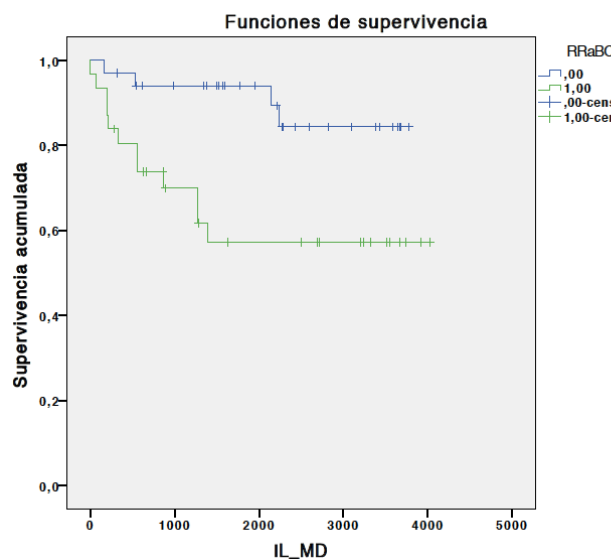
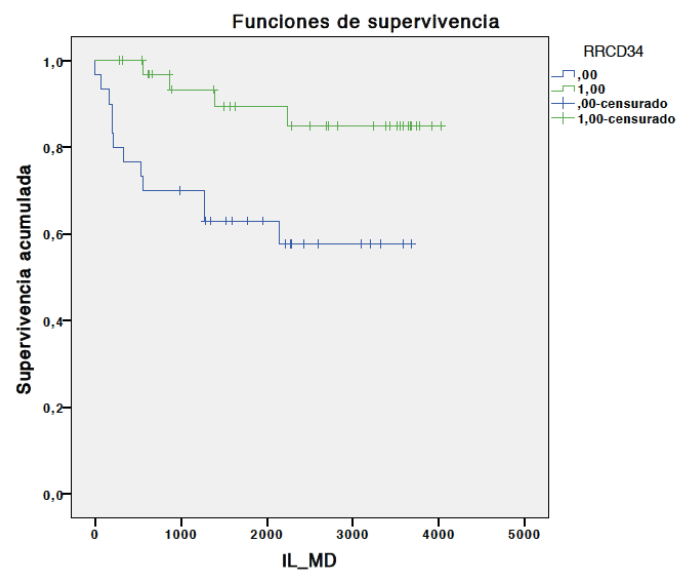


Figura 42. Periodo libre de metástasis a distancia en función de la expresión de CD34 por PCR. (en verde los melanomas con expresión de CD34)



### I.5.2. Intervalo libre de metástasis a distancia (en variables IHQ)

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo libre de metástasis a distancia, siendo menor en los melanomas primarios que en el estudio IHQ mostraban:

- positividad en más del 90% de las células tumorales con ON, ( $p=0,029$ ) (Fig. 43)
- cualquier positividad nuclear frente a CD34, con una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,000$ ) (Fig. 44)

Por lo tanto, se asoció a un intervalo libre de metástasis más corto, la inmunotinción difusa en más del 90% de las células tumorales frente a ON, y la tinción nuclear, incluso focal, frente a CD34.

**Figura 43. Curva de periodo libre de metástasis en función de la expresión osteonectina/SPARC (en verde los casos que expresan las variables estudiadas)**

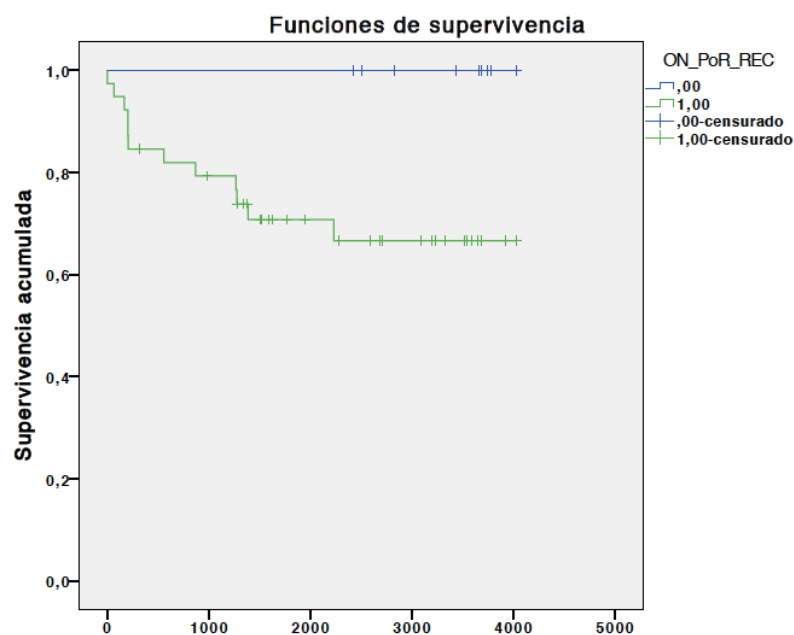
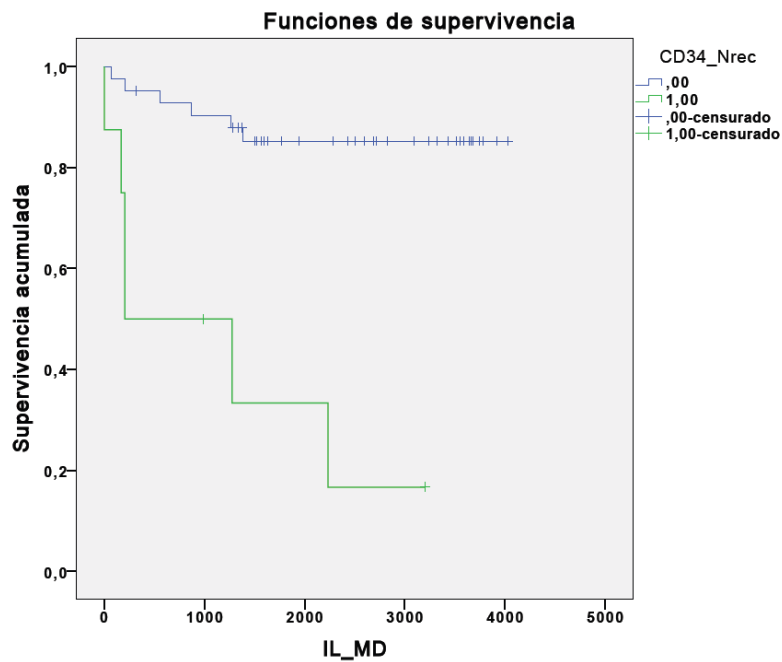


Figura 44. Curva de periodo libre de metástasis a distancia en función de la expresión nuclear de CD34 (en verde los melanomas que expresan CD34 nuclear)



### Intervalo de supervivencia

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de supervivencia, siendo menor en los melanomas primarios que en el estudio IHQ mostraban:

- positividad en el 95% de las células para CD133 ( $p=0,011$ ) (Fig.45)
- positividad en más del 90% de las células tumorales con ON, ( $p=0,035$ ) (Fig. 46)

Figura 45. Curva de periodo de supervivencia en función de la expresión de CD133 en más del 95% de la celularidad .

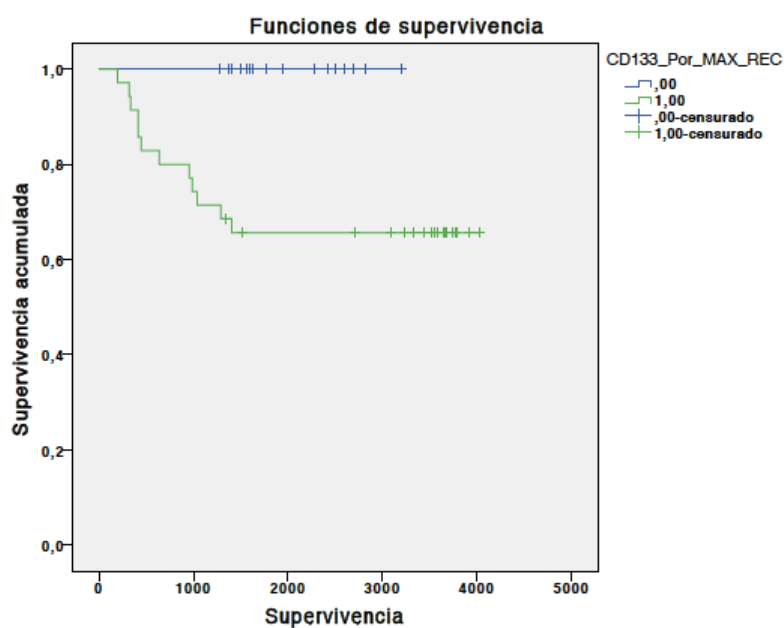
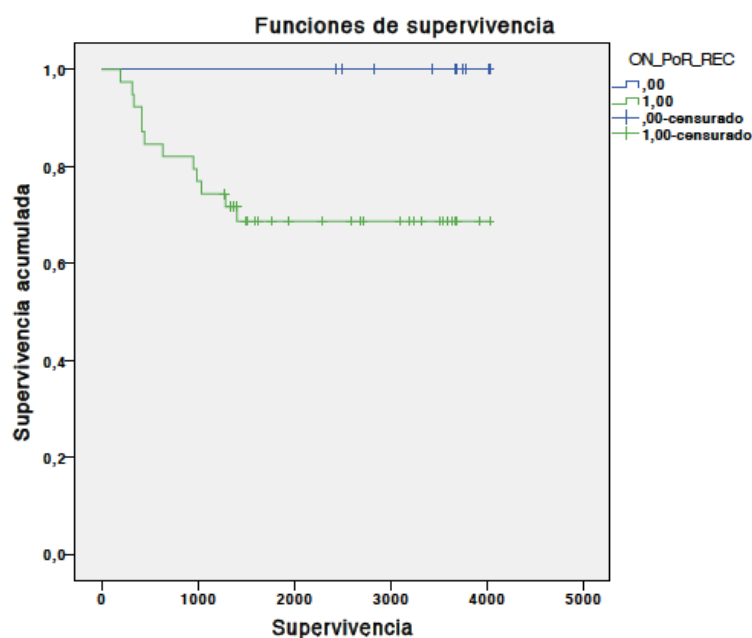


Figura 46. Curva de periodo de supervivencia en función de la expresión de ON/SPARC en más del 95% de la celularidad .



## I.6. MODELOS PREDICTIVOS: REGRESIÓN LOGÍSTICA Y ÁREAS BAJO CURVA

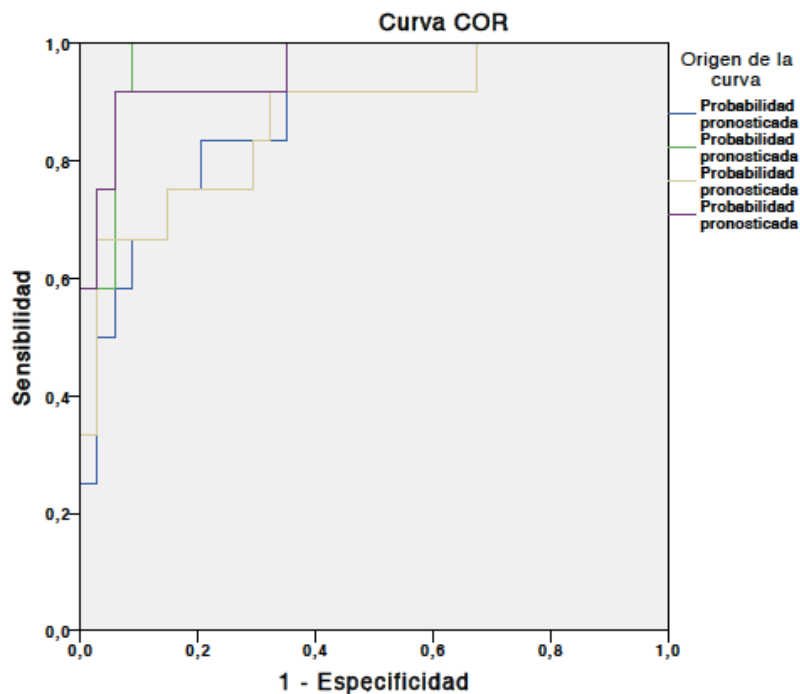
### I.6.1. Áreas bajo la curva para metástasis a distancia (Tabla 45, Fig. 47)

En el modelo básico de predicción, incluyendo como parámetros el índice de Breslow y la ulceración, se predice el 89,2% de los casos de metástasis.

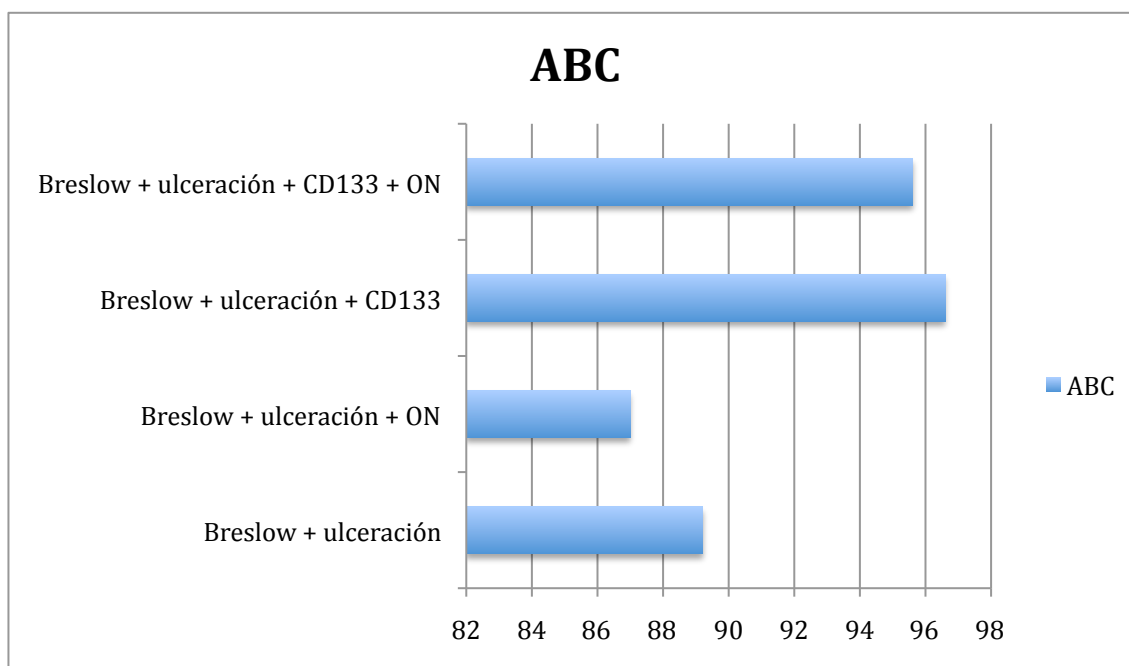
Al añadir a este modelo la expresión inmunohistoquímica de CD133 se predice el 96,6% de los casos con metástasis. Sumando la inmunotinción para CD133 y ON, se alcanza el 95,6%.

**Figura 47. Valor predictivo para metástasis a distancia de los melanomas primarios. A: Curva COR; B: área bajo la curva (ABC)**

A.



## B.



**Tabla 45. Área bajo la curva (curvas COR) e intervalos de confianza para las variables asociadas a metástasis a distancia**

Variable	ABC	(IC 95%)
Breslow+ulceración	0,892	(0,797-0,987)
Breslow+ulceración+CD133	0,966	(0,917-1,000)
Breslow+ulceración+ON	0,870	(0,746-0,995)
Breslow+ulceración+CD133+ON	0,956	(0,893-1,000)
ABC: Área bajo curva		

Nuestro estudio no sólo relaciona la inmunotinción de CD133 con una mayor capacidad metastásica de los tumores primarios, sino que además incrementa el valor predictivo de los parámetros clásicos (Breslow y ulceración)

### I.6.2. Regresión logística.

En la **regresión logística** tomando como variable dependiente el desarrollo de metástasis a distancia, se observó que el mejor modelo predictivo de metástasis es el que incluye como variables el índice de Breslow y la **tinción nuclear de CD34** (a pesar de que el CD34 nuclear no fue significativo tomado de forma aislada). Existiría cierto grado de multicolinealidad entre el CD34 y la ulceración, aportando una mayor predicción al modelo la utilización de CD34 nuclear frente a la ulceración.

## I.7. CORRELACIONES ENTRE LAS VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS Y LAS VARIABLES DE EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-PCR

### I.7.1. Resultados CD34

#### **Correlación entre la expresión fenotípica (IHQ) y génica (PCR)**

Se realizó un estudio de correlación entre la expresión inmunohistoquímica de CD34 y la expresión de ARN mensajero por PCR (Tabla 46)

**Tabla 46. Correlación entre la expresión IHQ de CD34 y la expresión de ARNm de los genes de EMT y CMC.**

Variable IHQ	Gen	Prueba	p
CD34_C	PROM1 (CD133)	Pearson	0,017
	PROM1 (CD133)	Spearman	0,014
	CD133	Spearman	0,006
CD34_N	CD34	KW	0,032
	CDH2	KW	0,002
	FN1	KW	0,003
	SPP1 (OP)	KW	0,020
CD34_EE	ABCB5	MW	0,001
	ABCG2	MW	0,028
	CD34	MW	0,000
	CDH1	MW	0,000
	CDH2	MW	0,000
	FN1	MW	0,005
	SPP1 (OP)	MW	0,000
	TWIST	MW	0,017
CD34_EI	ABCB1	MW	0,028
	ABCG2	MW	0,001
	CDH2	MW	0,048
	FN1	MW	0,018
CD34_C: tinción citoplasmática para CD34			
CD34_N: tinción nuclear			
CD34_EE: tinción del estroma extratumoral			
CD34_EI: tinción del estroma intratumoral			

En las correlaciones paramétricas se estudió la expresión inmunohistoquímica a nivel **citoplasmático y endotelial vascular**, y se correlacionó con la expresión por PCR de todos los genes estudiados.

Se observó la existencia de correlación positiva únicamente de la tinción **citoplasmática** de CD34 con la expresión por PCR de CD34 ( $p=0,017$ )

En las correlaciones no paramétricas (Rho de Spearman) se encontró una correlación significativa entre la tinción **citoplasmática** de CD34 ( $p=0,014$ ), y una correlación inversa con la expresión de PROM1 (CD133) por PCR ( $p=0,006$ ).



Así mismo, en el test de Kruskal-Wallis la expresión **nuclear** de CD34 se correlacionó con la expresión de ARN de CD34 ( $p=0,032$ ), CDH2 ( $p=0,002$ ), FN1 ( $p=0,003$ ), SPP1 ( $0,020$ ). Los melanomas que presentaban inmunotinción nuclear para CD34 tenían una menor expresión de CD34, y mayor expresión de CDH2, FN1 y SPP1.

La correlación de la expresión de los genes con la tinción del **estroma extratumoral** se estudió mediante el test de Mann-Whitney, destacando una correlación con la expresión de CD34 y CDH1, e inversa con la expresión de ABCB5, ABCG2, CDH2 y FN1. De igual manera se observó una correlación inversa entre la tinción con CD34 del **estroma intratumoral** y la expresión por PCR de ABCB1, ABCG2, CDH2 y FN1. El resto de estudios no fueron estadísticamente significativos.

### 1.7.2. Resultados CD133.

En las correlaciones paramétricas (correlación de Pearson) se observó una correlación de la expresión de CD133 (porcentaje del número de células tumorales) con la expresión de ARN mensajero de Twist, correlación positiva de 0,223 ( $p=0,029$ ) y en las no paramétricas (Rho de Spearman) con Twist, con un coeficiente de correlación de 0,243 ( $p=0,017$ ) y PROM1 (CD133) con un coeficiente de correlación de 0,250 ( $p=0,014$ )

### 1.7.3. Resultado del resto de variables.

En el resto de las variables se encontraron algunas correlaciones paramétricas estadísticamente significativas ( $p<0,005$ )(Tabla. 47):

- La tinción citoplasmática de cadherina-N se correlaciona con la expresión de ARN de CDH2 ( $p=0,246$ ), FN1 ( $p=0,285$ ), SPARC ( $p=0,421$ ) y TWIST( $p=0,205$ )
- La tinción citoplasmática de Osteopontina se correlaciona con la expresión por RT-PCR de ON/SPARC ( $p=0,223$ ),e inversamente con Twist ( $p=0,016$ )
- La tinción citoplasmática del Fibronectina se correlaciona inversamente con la expresión del gen Snail 1y Snail 2.
- La expresión citoplasmática de ABCB5 se correlaciona inversamente con la expresión del gen Twist.

**Tabla 47. Correlaciones entre los parámetros inmunohistoquímicos y la expresión de los genes de EMT y CMC**

PARÁMETRO IHQ	PARAMETRO RT-PCR	CORREACIÓN DE PEARSON	P
CADHERINA-N	CDH2	0,246	p=0,015
	FN1	0,285	p=0,005
	SPARC	0,421	p=0,000
	TWIST	0,205	p=0,044
OSTEOPONTINA	SPARC	0,223	p=0,031
	TWIST	-0,250	p=0,015
FIBRONECTINA	SNAIL 1	-0,209	p=0,040
	SNAIL 2	-0,209	p=0,040
ABCB5	TWIST	-0,244	p=0,016

En el estudio de correlaciones no paramétricas se observó también la existencia de una correlación entre algunos parámetros inmunohistoquímicos y la expresión de los genes por RT-PCR (Tabla 48)

**Tabla 48.-Correlaciones paramétricas entre variables inmunohistoquímicas de TEM y CMC , y la expresión de los genes estudiados.**

PARÁMETRO IHQ	PARÁMETRO RT-PCR	RHO DE SPEARMAN	P
OSTEOPONTINA	SPARC	0,235	0,022
	ABCB5	-0,219	0,032
ABCB5	ABCB5	-0,232	0,021
	SNAIL 2	-0,219	0,031
OSTEONECTINA	ABCG2	-0,203	0,045
CADHERINA-N	SPARC	0,229	0,024
FIBRONECTINA	TWIST	-0,264	0,009

## I.8. CORRELACIÓN DE LOS MARCADORES DE EMT Y CMC CON EL ESTADO MUTACIONAL DE BRAF Y NRAS

### I.8.1. Estudio por RT-PCR de la expresión génica de marcadores de EMT y CMC:

Se estudió la correlación del estado mutacional de BRAF y NRAS con la expresión de genes relacionados con la EMT y con las células madre tumorales.

La expresión de **ABCB5** se correlacionó con **mutaciones en NRAS** ( $p=0,015$ ), y con la ausencia de mutaciones en BRAF ( $p=0,015$ ).

No se observaron otras asociaciones estadísticamente significativas con el resto de genes estudiados.

### I.8.2. Perfil inmunofenotípico para marcadores de EMT y CMC

#### I.8.2.1. Estado mutacional de BRAF:

En las pruebas no paramétricas (Mann-Whitney) se observó una correlación entre la mutación en el gen BRAF y una mayor inmunotinción en las células tumorales, referente al porcentaje de células positivas, frente a osteopontina, osteonectina/SPARC y fibronectina, todos ellos marcadores de EMT.

Así mismo, también se observó una correlación con la intensidad de inmunotinción frente a osteopontina. De todos los melanomas primarios con tinción frente a osteopontina, el 73,75% tenían una mutación en BRAF. Igualmente, de todos los melanomas con BRAF mutado, el 89,39% mostraron positividad débil, moderada o intensa frente a osteopontina a nivel citoplasmático.

También se correlacionó con la expresión citoplasmática de ABCB5 ( $p=0,005$ ), marcador de célula madre tumoral, siendo mayor el número de células con tinción en los melanomas con mutación de BRAF. Los resultados se resumen en la tabla 49.

**Tabla 49. Correlación entre la mutación de BRAF y la tinción IHQ para marcadores de EMT y CMC**

Variable IHQ	P	Prueba
OP	0,006	MW
ON	0,028	MW
FN	0,024	MW
OP_i	0,002	CHI
ABCB5	0,005	MW

OP\_I: Intensidad de tinción de Osteopontina  
MW: Mann Whitney  
CHI: Chi Cuadrado (Tablas cruzadas)

### 1.8.2.2. Estado mutacional de NRAS

Se encontró únicamente una relación casi estadísticamente significativa entre la ausencia de mutación en NRAS (NRAS wild type) y la tinción citoplasmática frente a osteopontina ( $p=0,050$ ), y estadísticamente significativa con la tinción citoplasmática de cadherina-N ( $p=0,021$ ). La mayoría (93,75%) de los tumores con positividad citoplasmática frente a cadherina-N no tenían mutación de NRAS.

### 1.8.3. Estado mutacional de BRAF y NRAS en función de las variables clínicas e histopatológicas:

Se observó una asociación estadísticamente significativa entre el sexo y el estado mutacional de estos genes, siendo la mutación de BRAF más frecuente en el sexo masculino, y la de NRAS más frecuente en el sexo femenino.

Además, se observó que el BRAF estaba mutado con más frecuencia en los melanomas con infiltrado linfocitario. Por el contrario, los melanomas con infiltración linfovascular de nuestra serie se asociaban a la ausencia de mutación de BRAF.

En el resto de parámetro estudiados, incluyendo la localización, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

## **II.-ESTUDIO DE TUMORIGENICIDAD EN LAS LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA**

### **II.1-ESTUDIO DE LA TUMORIGENICIDAD DE LÍNEAS CELULARES PROCEDENTES DE MELANOMA PRIMARIO (WM-115) Y DE SU METÁSTASIS (WM-266-4)**

Tras la inoculación de células de las líneas celulares comerciales: WM-115, procedente de un tumor primario, y WM-266-4 derivada de una metástasis del tumor primario de WM-115, se desarrollaron lesiones tumorales en los puntos de inoculación para ambas líneas, comprobándose su tumorigenicidad. No obstante, se apreciaron diferencias en la velocidad de crecimiento de las mismas, desarrollándose más rápido tumores en los ratones inoculados con la línea procedente de la metástasis. Los ratones nude inoculados se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron 15 mm de diámetro, lo que ocurrió a los 77 días tras la inoculación de las células de WM-115 (L1), y tras 35 días de la inoculación con la línea WM-266-4, metastásica (L2).

En las tablas 50 y 51 se muestra la evolución de peso de los animales durante la experiencia de tumorigenicidad.

En los estudios macroscópico e histopatológico no se observaron metástasis.

Destacó que los tumores desarrollados por inoculación intramuscular presentaron un mayor tamaño que los inoculados por vía subcutánea. En las tablas 52 y 53 se indican los tamaños de los tumores producidos a partir de ambas líneas celulares, haciendo referencia a la vía de inoculación de las células tumorales.

**Tabla 50. Evolución del peso de los ratones xenotransplantados con la línea WM-115 procedente de melanoma primario**

XENOTRANSPLANTE a partir de la LÍNEA CELULAR WM-115	peso día 8	peso día 28	peso día 77
<b>L1-1</b>	25,1g	29,3g	30,4g
<b>L1-2</b>	27,4g	29,7g	29,2g
<b>L1-3</b>	30,7g	27,7g	28,2g
<b>L1-4</b>	28,3g	31,3g	30,3g
<b>L1-5</b>	28,3g	26g	36,5g
<b>Peso en gramos (g)</b>			

**Tabla 51. Evolución del peso en ratones xenotransplantados con la línea WM-266-4 procedente de un melanoma metastásico**

XENOTRANSPLANTE a partir de la LÍNEA CELULAR WM-266-4	peso día 8	peso día 28	peso día 35
<b>L2-1</b>	26,1g	29,5g	31,3g
<b>L2-2</b>	30,2g	25,2g	29g
<b>L2-3</b>	27,9g	30,6g	28,8g
<b>L2-4</b>	23,4g	34,8	30,5g
<b>L2-5</b>	28,3g	36,7g	26,7g
<b>Peso en gramos (g)</b>			

**Tabla 52. Tamaño del tumor obtenido a partir de las células inoculadas con la línea WM-266-4 (melanoma metastásico)**

	LOCALIZACION	TAMAÑO TUMOR (mm)	PESO TUMOR (g)
<b>L2-1</b>	im	26,4 x 20,3 x 15,4	3,6
	sc	26,3x11,7x13	0,9
<b>L2-2</b>	im	28,2x18,6x16	3,1
	sc	30,3x5,6x7,8	1,1
<b>L2-3</b>	im	16,1x13,7x11,1	1,4
	sc	Ausente	0
<b>L2-4</b>	im	15,1x4,6x35,8	2,8
	sc	12,6x21,6x18	0,6
<b>L2-5</b>	im	28,4x8,8x17,3	3,8
	sc	21,3x17,3x12,3	1,2
mm: milímetros ; g: gramos			
im: intramuscular			
sc: subcutánea			

**Tabla 53. Tamaño tumoral en el momento del sacrificio de los ratones inoculados con la línea WM-115 (melanoma primario)**

	LOCALIZACION	TAMAÑO TUMOR (mm)	PESO TUMOR (g)
<b>L1-1</b>	im	0,88x0,63x0,42	2,8
	sc	0,42x0,48x0,37	0,2
<b>L1-2</b>	im	0,99x0,7x0,57	3
	sc	0,88x0,47x0,33	1,4
<b>L1-3</b>	im	0,68x0,46x0,34	1,1
	sc	0,42x0,3x0,2	0,2
<b>L1-4</b>	im	20,3x13,3x7,7	1,9
	sc	13,95x9,9x6,2	0,5
<b>L1-5</b>	im	25,7x19,3x14,99	5,6
	sc	11,3x5,8x4,3	0,3
<b>im: intramuscular</b>			
<b>sc: subcutánea</b>			

El estudio histopatológico reveló que los tumores xenotransplantados a partir de las células de melanoma en cultivo estaban formados por células melánicas atípicas, densamente dispuestas, de morfología variable, fusiforme o epitelioides, con núcleos grandes hipercromáticos, mitosis, focos de necrosis, y con un infiltrado linfocitario asociado, como se recoge en las tablas adjuntas (tablas 54 y 55).

Se observa que la necrosis y la morfología epitelioides son más frecuentes en los tumores obtenidos de la línea metastásica, y a su vez, tienen un promedio de mitosis más elevado que los tumores derivados de la línea primaria (59 frente a 23,4). Las características histopatológicas quedan reflejadas en las tablas 54 y 55.

**Tabla 54. Características histopatológicas de los tumores xenotransplantados con la línea derivada de melanoma primario WM-115 (L1)**

TUMOR	CELULARIDAD	MITOSIS/10HPF	INFLAMACIÓN	INFILTRACIÓN	NECROSIS
L1-1 IM	FUSIFORME	27	NO	MUSCULAR	NO
L1-1 SC	EPITELIOIDE	16	LEVE	SUBCUTÁNEA	NO
L1-2 IM	FUSIFORME	24	LEVE	MUSCULAR	SÍ
	>EPITELIOIDE				
L1-2 SC	FUSIFORME	30	LEVE	MUSCULAR	SÍ
	>EPITELIOIDE			PERINEURAL	
L1-3 IM	FUSIFORME	20	NO	MUSCULAR	NO
L1-3 SC	FUSIFORME	17	NO	SUBCUTÁNEA	SÍ
	CON CLONES EPITELIOIDES				
L1-4 IM	FUSIFORME Y EPITELIOIDE	28	LEVE	MUSCULAR	SÍ
				PERIOSTAL	
L1-4 SC	EPITELIOIDE	21	LEVE- MODERADA	MUSCULAR	NO
			MODERADA		
L1-5 IM	EPITELIOIDE Y FUSIFORME	22		MUSCULAR, PERINEURAL	SÍ
L1-5 SC	EPITELIOIDE (MINIMO COMPONENTE FUSIFORME)	29	NO	SUBCUTÁNEA, MUSCULAR	NO

IM: intramuscular, SC: subcutáneo



**Tabla 55. Características histopatológicas de los tumores xenotransplantados con la línea derivada de melanoma metastásico WM166-4 (L2)**

TUMOR	CELULARIDAD	MITOSIS/10HPF	INFLAMACIÓN	INFILTRACIÓN	NECROSIS
L2-1 IM	EPITELIOIDE	92	PERITUMORAL Y EN NECROSIS	MUSCULAR	SÍ
L2-1 SC	EPITELIOIDE	53	ASOCIADA A NECROSIS	SUBCUTÁNEA	SÍ
L2-2 IM	EPITELIOIDE	56	ASOCIADA A NECROSIS	MUSCULAR, PERINEURAL	SÍ
L2-2 SC	EPITELIOIDE	64	ASOCIADA A NECROSIS	SUBCUTÁNEA	SÍ
L2-3 IM	EPITELIOIDE	61	ASOCIADA A NECROSIS	MUSCULAR	SÍ
L2-4 IM	EPITELIOIDE	60	ASOCIADA A NECROSIS	MUSCULAR	SÍ
L2-4 SC	EPITELIOIDE	46	ASOCIADA A NECROSIS	SUBCUTÁNEA	SÍ
L2-5 IM	EPITELIOIDE	56	ASOCIADA A NECROSIS	MUSCULAR	SÍ
L2-5 SC	EPITELIOIDE	43	ASOCIADA A NECROSIS	SUBCUTÁNEA	SÍ

IM: intramuscular, SC: subcutáneo

## II.2. TUMORIGENICIDAD DE LA LÍNEA SK-MEL-28 EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD133 Y DE LA LÍNEA CD133+ MEL-RC-08

Tras 140 días de seguimiento (tabla 56) en los ratones inoculados por vía intravenosa (L3R1, L3R2, L3R3, L3R4, L3R5, L3R6, L3R7) no se observó desarrollo de lesiones tumorales. Tras el estudio necrópsico, se confirmó la ausencia de lesiones metastásicas en estos mismos

**Tabla 56. Tabla de evolución del peso de los ratones nude L3 tras inoculación intravenosa e intramuscular/subcutánea de células SK-MEL-28 CD133+, SK-MEL-28 CD133-, y Mel-RC-08**

L3	Peso día 21	Peso día 34	Peso día 51	Peso día 62	Peso día 73	Peso día 84	Peso día 91	Peso día 105	Peso día 113
R1	29'2	30'4	31'4	31'6	32'7	32'7	34	33'1	32'7
R2	29'8	32'9	32'3	32'7	33'5	33'3	35'5	36	34'7
R3	29	30'5	31'2	28'2 *	31'5	33'5	30'4	30'9	NV
R4	27'3	29'5	31'8	29'6	33'3	31'8	33'9	33'3	33'4
R5	29'1	35'2	30	32	33'3	29'4	30'6	31	27'2
R6	26'3	27'5	27'9	28'9	30'6	29'8	30'1	30'9	30
R7	30'5	32'3	32'2	34'1	34'2	34'7	35'5	33'9	35'5
R8	29	30'8	30'3	32	32'5	32'9 *	31'8	24'7	NV

NV: NO VALORABLE por deceso del nude NULI 8  
 Peso en gramos  
 \* aparición de tumor palpable en la zona de inoculación)

En los ratones con inoculación por las vías intramuscular y subcutánea, se desarrolló tumoración palpable en L3R3, xenotransplantado con células SK-MEL-28 sin expresión de CD133(CD133-), y en L3R8, inoculado por vía subcutánea e intramuscular con células de la línea Mel-RC-08, que contiene un 84% de células CD133 +. Pero el tumor observado en L3R8 no se pudo valorar porque el ratón murió días antes de la fecha prevista para el sacrificio. No se desarrollaron tumores valorables en las inoculaciones a partir de células CD133+ de SK-MEL-28.

### II.3. TUMORIGENICIDAD DE LAS CÉLULAS CD133+ Y CD133-, OBTENIDAS POR SEPARACIÓN MAGNÉTICA A PARTIR DE LA LÍNEA SK-MEL-28 Y COMPARACIÓN CON LAS LÍNEAS SK-MEL-28 Y MEL-RC08.

Se siguió la evolución de los ratones observando la aparición de tumoraciones macroscópicamente detectables, procediendo en ese caso a su medición (volumen en mm<sup>3</sup>, de acuerdo a la fórmula:  $VT (mm^3) = TT / 6 \times 0'5 \times longitud \times (anchura)^2$ ), y pesándolos de manera periódica (Tabla 57).

Sólo se objetivó el desarrollo de tumor en vivo en los ratones con inoculación subcutánea, observándose un mayor volumen tumoral en los ratones inoculados con la línea MEL-RC-08, con alto porcentaje de células CD133 +, que en los inoculados con la línea SK-MEL-28. Los tamaños tumorales en los ratones inoculados con la línea SK-MEL-28 fueron similares , independientemente de la positividad o negatividad para CD133 de las células inoculadas. Lamentablemente la muestra fue escasa debido a la falta de desarrollo de tumores en los ratones con inoculación intravenosa y al deceso de algunos ratones durante el proceso. La evolución del volumen tumoral de los xenotransplantes en los ratones L4 se recoge en la tabla 57.

A los 175 días de la inoculación se procedió al sacrificio de los ratones para su estudio necrópsico. Se constató una única metástasis a distancia, de localización retroperitoneal, en un ratón con inoculación intravenosa de células SKMEL-28, CD133+. (Fig.48).

**Tabla 57. Evolución del volumen tumoral de los xenotransplantes en los ratones L4**

	LINEA	CD133	VI	VT d81	VT d93	VT d101	VT d110	VT d114	VT d130	VT d149	VT d175
L4R2	SKMEL	+	iv	0	0	0	0	0	0	0	663,66
L4R7	SKMEL	+	sc	0	0,26	3,14	0,26	190,85	32,72	150,8	261,8
L4R15	MELRC	+	sc	0	0,52	392,7	10,47	94,25	261,8	872,32	1178,1
L4R16	MELRC	+	sc	0,26	0,26	65,45	2,09	167,55	261,8	942,48	1340,41
L4R9	SKMEL	-	sc	0,52	45,82	9,42	0,52	0,52	20,94	897,97	261,8
L4R10	SKMEL	-	sc	0	0,39	1,31	0,06	3,14	94,25	217,82	233,26

SKMEL: Línea SK-MEL-28; MELRC: Línea MEL-RC08 con 84% de células CD133+

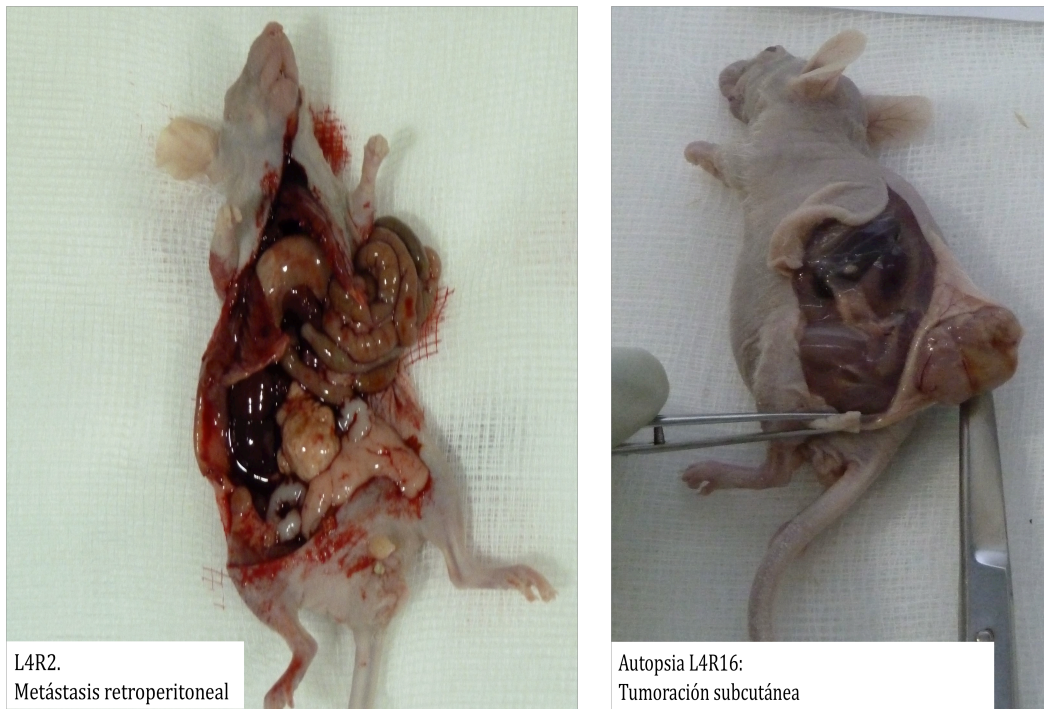
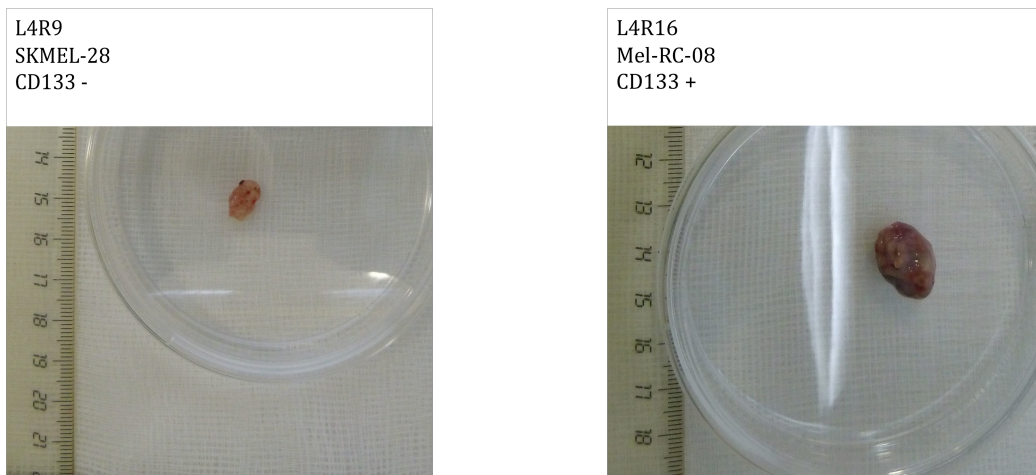
VI: vía de inoculación

VT: volumen tumoral

iv: intravenosa

sc: subcutánea

d: día

**Figura 48. Necropsia de los ratones L4.****Figura 49. Tumores obtenidos a partir de xenotransplantes**

Una vez disecados los tumores (Fig.49) se tomó una muestra para estudio morfológico (Fig. 50) y para cultivo (Fig. 51) y el resto, se procesó para el estudio mediante citometría de flujo de la expresión de marcadores de EMT y de células madre, en comparación a las líneas primarias SK-MEL.28 y MELRC08. Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 58.

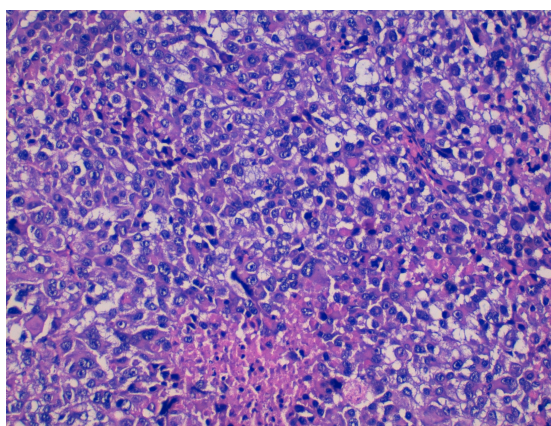
**Tabla 58. Expresión de marcadores de EMT y célula madre en los tumores obtenidos por xenotransplante, mediante citometría de flujo.**

	L4R2*	L4R7	LAR9	L4R10	L4R15	L4R16	LÍNEAS ORIGINALES	
Línea de procedencia	SK-MEL28 MG				MELRC08		SK-MEL28	MELRC08
CD133 pre	+	+	-	-	86%	86%	13%	86%
NCAD	0	0	0	0,19	8,47	1,4	7	61,27
ECAD	1,57	47,34	84,68	77,19	81,76	63,11	10	16
CD20	0	0	0	0	0	0	0	0
ABCG2	0,04	5,16	6,47	3,16	2,61	5,47	0,98	2,61
MDR1	1,53	39,06	35,36	30,33	14,06	59,74	5,18	7,87
ABCB5	0	0	0	0	5,65	4,62	1,06	0
CKIT	0	0	0,51	0	42,62	0	0	3,17
CD34	0	0	0	0	0	0	0	1,37
CD90	0,04	2,45	3,58	2,17	0,79	0	0	0
CD271	0	3,08	0	0	1,18	0,69	4,68	8,44
CD133	18,95	29,45	7,79	8,48	50,31	37,18	12,23	82,03

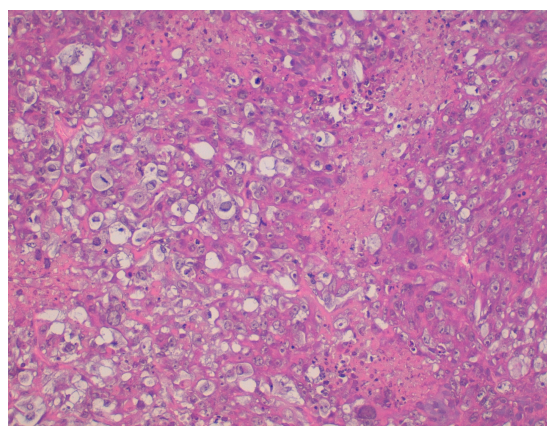
SK-MEL20 MG: línea SK-MEL-28 con separación magnética en función de la expresión de CD133.  
 CD133 pre: expresión de CD133 antes de la inoculación  
 NR: separación magnética no realizada. Se trata de las líneas celulares iniciales.  
 \*: única metástasis obtenida

**Figura 50. Imagen histológica de la metástasis obtenida en L4R2(A), y del tumor subcutáneo en L4R16 (B) (H.E 200x)**

A.

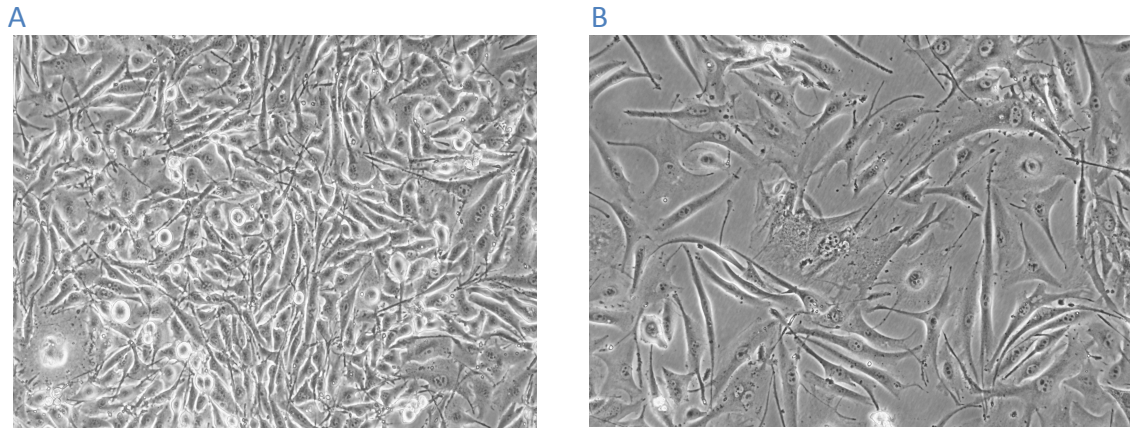


B.





**Figura 51. Imagen de los cultivos celulares obtenidos a partir de los tumores xenotransplantados en L4R2 (A) y L4R16 (B).**



### **II.3.1. Marcadores de EMT en los xenotransplantes**

Con respecto a los marcadores de EMT, se observaron algunos cambios en los tumores xenotransplantados con relación a las líneas originales:

**-cadherina-N:** Desapareció la expresión en los distintos tumores derivados de SK-MEL-28 (con independencia de la expresión o no de CD133) y disminuye entre un 86,8% y un 97,7% en los tumores de MELRC08.

**-cadherina-E:** Se observó un aumento de hasta 8 veces en todos los tumores subcutáneos, pero no en la metástasis retroperitoneal derivada de SK-MEL-28. Además, ese aumento fue más pronunciado en las CD133-(entre 7,7 y 8,4 veces) que en las CD133+(4,7 veces). Sin embargo, también se incrementó entre 394% y 511% en los tumores derivados de MELRC08 (con un contenido de hasta 90% de células CD133+)

La expresión de cadherina-E parece aumentar con la tumorigénesis, mientras paralelamente desaparece la expresión de cadherina-N, hallazgo que parece estar relacionado con el paso de un fenotipo mesenquimal de las células en cultivo, a un fenotipo “epitelial”. Este fenómeno parece ser independiente de la presencia o ausencia de células con marcadores de CMC como CD133.

### II.3.2. Marcadores de CMC en los xenotransplantes:

En cuanto a los marcadores de célula madre:

**-ABCG2:** Se observó un incremento en todos los tumores subcutáneos, pero no en la metástasis. No se observaron diferencias entre los tumores derivados de la porción CD133+, y los de la CD133-. En cuanto a los derivados de la línea Mel-RC-08, la expresión de ABCG2 se mantuvo similar a la línea de origen en un caso, y se duplicó en otro.

**-MDRI (ABCB1):** Se observó un incremento de más de 5 veces en todos los tumores subcutáneos, pero no en la metástasis. No se observaron diferencias entre los tumores derivados de la porción CD133+, y los de la CD133-. En cuanto a los derivados de la línea Mel-RC-08, la expresión de MDR1 (ABCB1) también se incrementó, pero en menor medida que en los derivados de SK-MEL-28 (entre 2 y 5 veces)

**-ABCB5:** Desapareció en todos los tumores derivados de SK-MEL- 28 (con o sin celularidad CD133+)y apareció la expresión en los tumores derivados de la línea MELRC08 (3113) .

**-CD90:** Se observó aparición de expresión de CD90 en todos los tumores derivados de SK-MEL-28, a pesar de no existir en la línea original, pero no en los de MELRC08. No se observaron diferencias entre los tumores derivados de las poblaciones CD133+ y CD133-

**-CD271:** En general, su expresión disminuyó en todos los tumores, incluidos los derivados de Mel-RC-08. En los derivados de SK-MEL-28 disminuyó en los derivados de la porción CD133+ y desapareció totalmente en los derivados de SK-MEL CD133-.

**-CD133:** Disminuyó a la mitad en los tumores derivados de MELRC08 (3113). En los distintos tumores derivados de SK-MEL-28 fue menor en los tumores obtenidos de la subpoblación negativa que en los de la subpoblación positiva.

Tanto la porción CD133 positiva como la CD133 negativa de la línea SKMEL-28, y la línea CD133+ Mel-RC-08 son tumorigénicas, y producen tumores heterogéneos en cuanto al marcador estudiado.

Durante la tumorigénesis aumentó la expresión de los marcadores de célula madre ABCG2, ABCB1, y CD90, pero no así en las metástasis. Aunque desafortunadamente la muestra es insuficiente para que estos hallazgos sean significativos, nuestros resultados experimentales apoyan los obtenidos en el estudio de melanomas humanos.

Disminuyeron ABCB5, CD271 y CD133, observándose una mayor disminución en los tumores derivados de CD133-; a excepción de la expresión de ABCB5 en los tumores derivados de MELRC08, donde se incrementó.



### III. DESARROLLO ARGUMENTAL

#### III.1. FACTORES DE EMT Y MARCADORES DE CMC EN RELACIÓN CON LOS PARÁMETROS CLÁSICOS DE PROGRESIÓN LOCAL

Observamos que los factores de EMT, fibronectina, osteopontina, cadherina-N y, sobre todo la osteonectina/SPARC, estaban aumentados en los melanomas en fase de crecimiento vertical. Podrían por lo tanto plantearse como marcadores de progresión tumoral. Estos hallazgos van en la línea de los resultados de estudios previos que implican a los marcadores de EMT en la progresión de los melanomas, confiriendo a las células un mayor potencial invasor<sup>73, 79, 90</sup>. En concreto, el grupo de la universidad de Queensland, relacionó la inducción de osteonectina/SPARC con el paso de fase de crecimiento radial a vertical en melanomas<sup>79</sup>. Además, al tratarse de marcadores inmunohistoquímicos, podrían ser de utilidad como factor pronóstico en el estudio rutinario de los melanomas primarios en las unidades de dermatopatología. La negatividad frente a la cadherina-N iría en contra de la fase vertical y una intensa positividad frente a la osteonectina/SPARC sería signo de que el melanoma se encuentra en fase vertical.

Por el contrario, nuestro estudio muestra que tanto la expresión génica de CD34 como su expresión proteica a nivel citoplasmático, son menores en los melanomas en fase de crecimiento vertical, por lo que su ausencia podría marcar la evolución a una fase más avanzada. Sin embargo, la inmunotinción nuclear de CD34 aumenta con el índice de Breslow, el número de mitosis, y la presencia de ulceración. Los tumores melanocíticos son clásicamente CD34 negativos<sup>129</sup>, independientemente de su benignidad o malignidad. No obstante se han descrito algunos casos en la literatura de melanomas, primarios y metastásicos, con inmunofenotipo CD34 positivo, definido como aberrante<sup>132, 133</sup>, sin que se haya establecido un valor pronóstico al respecto. Algunos autores lo consideran un marcador de transdiferenciación endotelial<sup>139</sup> y, por tanto, lo asocian a la progresión tumoral. Pero en su revisión de 60 melanomas, no hallaron sin embargo positividad frente a CD34 en ninguna de las 6 metástasis de

melanoma incluidas en el estudio. Estos autores postulan que el mecanismo patogénico de remodelación estromal en los melanomas sería diferente al de los carcinomas, y estaría relacionado con osteonectina/SPARC (cuya expresión estaría ligada a la malignidad en las lesiones melánicas)<sup>139</sup>. El hecho de que en nuestro estudio la expresión de ARNm de CD34 sea menor en los melanomas en fase de crecimiento vertical, es decir, más avanzados, entra en aparente contradicción con los hallazgos de este grupo<sup>139</sup>, que considera el CD34 en las células tumorales del melanoma como un marcador de progresión, y, por lo tanto de peor pronóstico. De hecho, en su revisión, encuentran un aumento progresivo de células tumorales positivas frente a CD34 al aumentar el nivel de Clark. No obstante, se trata de un estudio basado en la expresión inmunohistoquímica y no especifican si la tinción en las células tumorales es nuclear o citoplasmática. En nuestro caso, la tinción nuclear de CD34 sí que va en la misma dirección que los hallazgos descritos, pero los resultados basados en la expresión del ARN mensajero por PCR y en la inmunotinción citoplasmática indicarían lo contrario. Esta correlación inversa entre la tinción nuclear y la expresión de ARNm tiene además significación estadística.

En cuanto al índice de Breslow, éste mostró una correlación positiva con la expresión de ARNm de OP (SPP1), además de otros factores de EMT como cadherina-N (CDH2), FN1, SNAIL-1, SNAIL-2, ON/SPARC y de célula madre, como ABCG2, PROM-1 (CD133); y una correlación negativa con CD34. Además, se traduce en un aumento de la intensidad de expresión de osteopontina en el estudio inmunohistoquímico a medida que aumenta el índice de Breslow. Estos hallazgos apoyan los citados anteriormente, con un aumento de expresión de los factores de EMT a medida que progresa la neoplasia. El aumento en la expresión de Cadherina-N marcaría el proceso de EMT, y estaría regulada por la vía PI3K/PTEN a través de Twist y Snail<sup>75, 140</sup>, lo que explicaría su aumento progresivo con la invasión, y, por lo tanto, con un mayor índice de Breslow. Se ha descrito que la osteonectina/SPARC regula a la baja la expresión de E-cadherina e induce la de osteopontina<sup>79</sup>.

Los marcadores de célula madre ABCG2 y CD133 se han descrito en las células iniciadoras de cáncer, o células madre cancerosas, derivadas de la expansión clonal de células atípicas, y a las que se atribuye la capacidad de tumorigénesis y de generar metástasis a distancia. La expresión de estos marcadores se ha relacionado con una

mayor agresividad, capacidad metastásica y quimiorresistencia<sup>141</sup>. Por lo tanto, parece lógico que aumenten en melanomas con mayor índice de Breslow, y de peor pronóstico.

Sin embargo, la correlación negativa con el ARNm CD34 sigue entrando en aparente contradicción con el grupo de Risio<sup>139</sup>, y podría deberse a la expresión estromal de CD34. Wessel y colaboradores<sup>142</sup> estudiaron la expresión de CD34 en los fibroblastos de la dermis normal, de los nevus y de los melanomas, y sus resultados mostraron fibroblastos CD34 positivos en la dermis normal y en los nevus, mientras que no se encontraban estas células en los melanomas. Nuestro estudio inmunohistoquímico mostró una mayor positividad del estroma extratumoral en melanomas con un índice de Breslow menor, hallazgo que podría ir en la línea de lo que este grupo describió, y, por el contrario, observamos un Breslow más alto en melanomas con inmunotinción nuclear para CD34.

En nuestro estudio, la expresión de ARNm de algunos marcadores de EMT (fundamentalmente osteonectina/SPARC, osteopontina, y fibronectina) y de célula madre (ABCG2) se correlacionan positivamente con la presencia de ulceración. Sin embargo la expresión de ARNm de CD34 muestra una correlación inversa. Estos hallazgos apoyan los descritos previamente y, a pesar de que la ulceración es un factor de riesgo independiente, todos los melanomas ulcerados de nuestro estudio son melanomas gruesos con mayor índice de Breslow, lo que explicaría en parte los resultados superponibles. Además, en nuestro estudio se establece una correlación entre la expresión de CD34 en el estroma extratumoral y la ausencia de ulceración y, por el contrario, la inmunotinción nuclear frente a CD34 se correlaciona con la ulceración. De hecho, el análisis multivariante muestra que la positividad frente a CD34 aumenta la capacidad predictiva pronóstica, en combinación con el Breslow, y supera el valor predictivo de la combinación del Breslow y la ulceración.

## III.2. EXPRESIÓN DE FACTORES DE EMT Y MARCADORES DE CMC EN RELACIÓN CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICA DE LOS PACIENTES.

La sobreexpresión en los tumores primarios de ARNm de los siguientes genes se asocia con el desarrollo de metástasis ganglionares y a distancia:

-marcadores de EMT: FIBRONECTINA1, SPP1 (OP) (más en metástasis hepáticas), osteonectina/SPARC);

-marcadores de CMC: ABCB5 (en metástasis ganglionares) y ABCG2.

Por el contrario, la mayor expresión en el tumor primario de ARNm de CD34, se asocia con la ausencia de metástasis a distancia.

Asimismo, a nivel inmunofenotípico, los siguientes marcadores se correlacionan con el desarrollo de metástasis:

-marcadores de EMT: osteopontina, y osteonectina/SPARC. Además, la positividad para osteopontina se observó en todas las metástasis hepáticas.

-marcadores de célula madre: CD133.

Un hallazgo singular de nuestro estudio ha sido la correlación de la positividad nuclear para CD34 en las células tumorales del melanoma primario con un acortamiento del periodo libre de metástasis a distancia, que le confiere valor pronóstico. La expresión de marcadores de EMT se ha correlacionado previamente con una mayor capacidad de progresión tumoral<sup>81, 143, 144</sup>, y de metástasis a distancia<sup>73, 140, 145, 146, 147</sup>. Nuestros hallazgos apoyan los publicados por el grupo de Rodríguez-Peralto y colaboradores, con una firma metastásica en los melanomas primarios, caracterizada por una sobrerregulación de genes relacionados con la EMT (cadherina-N, ON/SPARC), confirmados por una mayor expresión inmunohistoquímica. Nosotros intentamos, además, definir un perfil de expresión en función de la localización de las metástasis. Así, observamos una mayor expresión de OP (SPP1) en los melanomas con metástasis hepáticas, de cadherina-E en melanomas con metástasis cerebrales y óseas; y de cadherina-N en aquellos con metástasis cutáneas a distancia. Aunque estos hallazgos han mostrado ser estadísticamente significativos, sería interesante ampliar el estudio con un mayor número de casos con metástasis a distancia.

Destaca la relación de la inmunotinción de CD133 con el desarrollo de metástasis a distancia, hasta el punto de que ningún melanoma negativo frente a CD133 las desarrolló. Esto comulga con la teoría de las células madre cancerosas. Recientemente se ha descrito la existencia de subpoblaciones de células madre cancerosas CD133+/CXCR4+ en melanomas con fenotipo invasor y mal pronóstico<sup>148</sup>, y la sobreexpresión de CD133 como factor de riesgo en la progresión y recurrencia del melanoma<sup>149</sup>. Nuestro estudio confirma estos hallazgos y confiere especial importancia a la ausencia de inmunotinción para CD133 en los melanomas primarios. ABCB5 también se ha relacionado previamente con la progresión tumoral y metástasis<sup>126</sup>.

Algunos autores defienden la hipótesis de que las células madre del melanoma son las generadoras de metástasis y las únicas capaces de establecer la heterogeneidad fenotípica del tumor primario<sup>150</sup>. Se reconocen como marcadores de célula madre de melanoma el CD133<sup>151</sup>, ABCG2 y ABCB5<sup>117,125</sup>. Su expresión se ha asociado a mayor riesgo de progresión, capacidad metastásica y quimiorresistencia<sup>149,151, 152</sup>.

No obstante, se cuestiona la existencia de estas células iniciadoras de melanoma, y Quintana y colaboradores<sup>134</sup> demostraron que entre múltiples marcadores estudiados, incluyendo ABCB5 y CD271, ninguno era capaz de distinguir células de melanoma tumorigénicas de las no tumorigénicas, y que estos marcadores parecían expresarse de forma reversible en las células del melanoma. Independientemente de las controversias vigentes, nuestro estudio muestra que los melanomas que evolucionan dando metástasis presentan una mayor expresión de ARN mensajero y mayor inmunotinción de CD133 y, al contrario, ninguno de los melanomas primarios CD133 negativo desarrolló metástasis en su evolución clínica. La inmunotinción con CD133 podría tener pues un valor pronóstico como predictor de desarrollo de metástasis a distancia y sugerimos que podría realizarse de forma rutinaria en el estudio de los melanomas primarios.

En apoyo a los hallazgos de Quintana y colaboradores, en nuestro estudio experimental fuimos capaces de desarrollar tumores subcutáneos en ratones atímicos tanto a partir de las fracciones CD133+ y CD133- de la línea SK-MEL-28, con independencia de la expresión inicial de este marcador de CMC, como con la línea Mel-RC-08, constituida mayoritariamente por células CD133+. Más aún, los tumores

obtenidos fueron heterogéneos en cuanto a la expresión de éste y otros marcadores de CMC (ABCB5, ABCB1, ABCG2, CD90 y CD271). En cuanto a la agresividad, en la línea de lo que describimos en nuestro estudio en tumores humanos, las líneas con celularidad CD133+ mostraron un crecimiento más rápido que las CD133-. Además, se desarrolló una única metástasis a distancia tras la inoculación intravenosa, correspondiente a la fracción CD133+ de SK-MEL-28, aunque obviamente el carácter aislado de este hallazgo es insuficiente para establecer conclusiones.

En cuanto al intervalo libre de metástasis a distancia, este se ve reducido en pacientes con melanomas primarios con mayor expresión de ARNm de ABCG2 y, a nivel inmunohistoquímico, con una expresión generalizada (>90% de las células tumorales) de ON. Un hallazgo original en nuestro estudio ha sido que la positividad nuclear de CD34, incluso en células tumorales aisladas, se asocia a una peor evolución de los pacientes y en particular al desarrollo temprano de metástasis a distancia.

En cuanto a la supervivencia, nuestro estudio encuentra una correlación entre la inmunotinción generalizada de CD133 en los melanomas primarios, y una menor supervivencia. Un resultado similar fue descrito por el grupo de Zapas, en 2012<sup>149</sup>. Además, nuestro estudio le confiere al marcador inmunohistoquímico CD133 valor como marcador pronóstico, sumado a los criterios clásicos como el índice de Breslow y la presencia de ulceración, incrementando su valor predictivo hasta el 96,6 %.

### **III.3. MARCADORES DE EMT Y CMC EN LAS DIFERENTES FASES EVOLUTIVAS DE PROGRESIÓN TUMORAL.**

En cuanto a la expresión inmunohistoquímica, la mayoría de los factores de EMT estudiados (ON/SPARC, OP, cadherina-N, Twist) disminuyeron en las fases finales del proceso metastásico, es decir, esencialmente en las metástasis a distancia ya establecidas, excepto Snail, que aumenta selectivamente en las metástasis ganglionares. Estos hallazgos son superponibles, al estudiar la expresión del ARNm, únicamente para la osteonectina/SPARC, que aumentaría en las fases iniciales de diseminación y disminuiría al establecerse las metástasis ganglionares y a distancia.

Sin embargo, sorprendentemente, la expresión de ARNm para el resto de los genes de EMT, FN1, cadherina-E (CDH1), cadherina-N (CDH2), y OP(SPP1), aumenta con la progresión tumoral.

En estudios previos se ha descrito un aumento de la expresión de factores de EMT en las metástasis de melanoma con respecto a los primarios, correlacionándola con la progresión tumoral<sup>153</sup>. Sin embargo, nuestros resultados muestran, como hallazgo diferencial, una disminución en fases tardías con metástasis ya establecidas, que de hecho apoyaría la teoría de la TME (EMT inversa). Este proceso se produce una vez que las células tumorales han alcanzado un nuevo tejido diana, donde las condiciones del medio podrían ser similares a las iniciales<sup>91, 92, 93</sup>.

En el estudio de marcadores de CMC, se confirma la presencia de células con inmunofenotipo de célula madre, tanto en los tumores primarios como en las metástasis, complementando los resultados descritos en el estudio publicado por el Centro de Melanoma de Maryland en 2010, que además mostraba mayor expresión de ABCB5 y CD133 en las metástasis<sup>126</sup>. Nuestro trabajo muestra una disminución de la expresión inmunohistoquímica y de ARNm de CD133 con la diseminación ganglionar. En lo que refiere a la expresión de ABCB5, la inmunotinción aumenta en las fases iniciales de diseminación (MT) y disminuye en las más avanzadas (MG y MD), lo que supondría un hallazgo diferencial con el citado estudio. Sin embargo, la expresión de ARNm de ABCB5 aumenta durante la progresión. Para entender esta situación paradójica, hay que decir que en la tinción inmunohistoquímica para ABCB5 se observa además de la tinción citoplasmática de las células tumorales, positividad en las células fusiformes del estroma y en los melanófagos.

Los melanomas primarios tienen una mayor inmunotinción para CD34 que las metástasis, observándose esta tinción tanto en las células tumorales, como en las del estroma extratumoral. Por el contrario, la tinción nuclear de CD34 en las células tumorales es más frecuente en las metástasis. El ARNm de CD34 se expresaría en mayor medida en MP y, particularmente en los MP delgados, que en metástasis, sin duda en relación con la expresión en el estroma extratumoral, puesta de relieve con la tinción inmunohistoquímica. Destacamos de nuevo el hallazgo de la tinción nuclear para CD34, más frecuente en las metástasis que en los melanomas primarios.

### III.4. MARCADORES DE EMT Y CMC EN RELACIÓN CON EL ESTADO MUTACIONAL DE BRAF Y NRAS

En cuanto al estado mutacional, la inmunotinción para los marcadores de EMT ON, FN, Twist y OP se asocia a la mutación de BRAF y la de OP y cadherina-N citoplasmática se asocia a la ausencia de mutación en NRAS. Sin embargo, no se observa ninguna correlación con la expresión génica de los marcadores de EMT.

En lo que respecta a los marcadores de CMC, la expresión del ARNm del gen ABCB5 se correlaciona con la existencia de mutación en NRAS y con la ausencia de mutación en BRAF. Sin embargo, sorprendentemente, a nivel proteico, la tinción citoplasmática de ABCB5 se correlaciona únicamente con la mutación de BRAF. Como hemos comentado previamente, en la inmunotinción con ABCB5 se observa además de la tinción citoplasmática de las células tumorales, positividad en las células del estroma y en los melanófagos. Por tanto, aparentemente, sería la suma de la expresión en las células tumorales y no tumorales, la que se asocia a la mutación de NRAS, mientras que la expresión exclusivamente en células tumorales se asocia a la de BRAF. Algunos autores defienden que la presencia de mutaciones en NRAS se asocia a una supervivencia más corta<sup>45, 46</sup> y es más frecuente en MM de rápido crecimiento<sup>47</sup>. Sirve de apoyo a esta interpretación nuestro hallazgo de que la expresión de ARNm de ABCB5, pero no la expresión IHQ, se asocia al desarrollo de metástasis ganglionares.

Por otro lado, aunque cabría esperar una correlación de los factores de EMT (ON, FN, Twist, OP y cadherina-N) con las mutaciones de NRAS, en nuestro estudio, sorprendentemente, la inmunotinción para todos estos marcadores se correlaciona con las mutaciones en BRAF o la ausencia de mutaciones en NRAS, mientras que el estudio del ARNm no muestra correlación alguna.



## 4. Conclusiones



## 4. CONCLUSIONES:

1.- En el estudio experimental, las líneas de melanoma humano son capaces de inducir el crecimiento tumoral y crear tumores heterogéneos respecto a la expresión de CD133 y otros marcadores de célula madre y EMT, con independencia de la expresión o no de este marcador en las células xenotransplantadas, aunque se observa una mayor velocidad de crecimiento en las células inicialmente CD133+.

2.-Una mayor expresión inmunohistoquímica de cadherina-N y osteonectina/SPARC y un aumento de expresión de ARN mensajero de fibronectina, osteonectina/SPARC y osteopontina son características de la fase de crecimiento vertical.

3.-La expresión de ARN mensajero de osteopontina (SPP1), cadherina-N (CDH2), FN1, SNAIL-1, SNAIL-2, ON/SPARC, ABCG2 y PROM-1 (CD133) muestra una correlación positiva con el índice de Breslow, mientras que en el estudio inmunohistoquímico sólo la osteopontina y la tinción nuclear para CD34 presentan esta correlación. Por el contrario, la expresión de ARN mensajero de CD34 tiene una correlación negativa con el índice de Breslow.

4.- La presencia de ulceración se correlaciona con la expresión inmunohistoquímica de osteonectina/SPARC, fibronectina y CD34 nuclear, y con un mayor nivel de ARN mensajero de ON/SPARC, OP, FN, CDH2, ABCB5, y tiene una correlación negativa con el ARN mensajero de CD34.

5.- En cuanto al estudio mutacional, una mayor inmunotinción citoplasmática de ABCB5, ON, OP, y FN se correlaciona con mutaciones en BRAF.

6.- En las metástasis está sobreexpresado el ARN mensajero de ABCB5, Cadherina-N, ON/SPARC, OP, FN1, en comparación con los melanomas primarios. Sin embargo, estas

diferencias desaparecen cuando se valora exclusivamente la inmunotinción en células tumorales, excepto para CD34 nuclear.

7.- El desarrollo de metástasis ganglionares y a distancia se correlaciona con la sobreexpresión de ARNm de FN1, OP(SPP1), ON/SPARC, ABCB5 y ABCG2. Dicha correlación se observa también inmunohistoquímicamente para osteopontina, osteonectina/SPARC, CD133 y CD34 nuclear.

8.- El tiempo de supervivencia se ve reducido en los pacientes con una inmunotinción generalizada para ON/SPARC y CD133 en el melanoma primario.

9.- La expresión de ARN mensajero de ABCG2, la inmunotinción nuclear para CD34, aunque sea focal, y la inmunotinción generalizada para ON/SPARC en las células tumorales del melanoma primario se asocian a un acortamiento del intervalo libre de metástasis a distancia.

10.-La inmunotinción para CD133 en las células tumorales del melanoma primario se correlaciona positivamente con una mayor capacidad metastásica, y particularmente cuando la tinción es intensa. El estudio de esta variable incrementa además el valor predictivo de los parámetros clásicos (índice de Breslow y ulceración).

## 5. Bibliografía



## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. MacLennan R, Green AC, McLeod GR, Martin NG. Increasing incidence of cutaneous melanoma in Queensland, Australia. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:1427-1432
2. Linos E, Swetter SM, Cockburn MG, Colditz GA, Clarke CA. Increasing burden of melanoma in the United states. *J Invest Dermatol* 2009; 129:1666-16674
3. Akushevich I, Kravchenko J, Ukraintseva S, Arbeev K, Yashin AI. Time trends of incidence of age-associated diseases in the US elderly population: Medicare-based analysis. *Age Ageing* 2013; 42:494-500
4. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe for 40 countries in 2012. *Eur J cancer* 2013; 49: 1374-1403
5. Nikolaou V, Stratigos AJ. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *British J dermatol* 2014; 170: 11-19
6. Cabanes A, Pérez-Gómez B, Aragonés N, Pollán M, López-Abente G. La situación del cáncer en España, 1975-2006. área de Epidemiología Ambiental y Cáncer, Centro Nacional de Epidemiología ISCIII. 2009. Madrid. Disponible en [http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-publicaciones-isciii/fd-documentos/Situacion Canceren Espana1975\\_2006\\_2010.pdf](http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-publicaciones-isciii/fd-documentos/Situacion Canceren Espana1975_2006_2010.pdf)
7. Rigel DS. Epidemiology of melanoma. *Semin Cutan Med Surg* 2010; 29:204-209
8. Marks R. The changing incidence and mortality of melanoma in Australia. *Recent Results Cancer Res* 2002; 160:113-121
9. Forsea AM, de Marmol V, de Vries E, Bailey EE, Geller AC. Melanoma incidence and mortality in Europe: new estimates, persistent disparities. *BR J Dermatol* 2012; 167: 1124-1130
10. Liu, Bessonova L, Taylor TH, Meyskens FL Jr, Anton-Culver H. A unique gender difference in early onset melanoma implies that in addition to ultraviolet light exposure other causative factors are important. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013;26:128-135. doi: 10.1111/pcmr.12035.

11. Ríos L, Nagore E, López JL, Redondo P, Martí RM, Fernández-de-Misa R, Soler B. Registro Nacional de melanoma cutáneo. Características del tumor en el momento del diagnóstico: 15 años de experiencia. *Actas Dermosifiliogr* 2013; 104: 789-799
12. Hoersh B, Leiter U, Garbe C. Is head and neck melanoma a distinct entity? A clinical registry-based comparative study in 5702 patients with melanoma. *Br J Dermatol* 2006; 155:771-777
13. Whiteman DC, Stickley M, Watt P, Hughes MC, Davis MB, Green AC. Anatomic site, sun exposure, and risk of cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2006; 24:3172-3177
14. Jemal A, Siegel R, Xu J et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 106-130
15. Criscione VD, Weinstock MA. Melanoma thickness trends in the United States, 1988-2006. *Journal of Investigative Dermatology* 2010; 130: 793-797
16. Garbe C, McLeod GR, Buettner PG. Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and central Europe. *Cancer* 2000; 89:1269-1278
17. Tryggvadóttir L, Gislum M, Hakulinen T, Klint A, Engholm G, Storm HH, Bray F. Trends in the survival of patients diagnosed with malignant melanoma of the skin in the Nordic countries 1964-2003 followed up to the end of 2006. *Acta Oncol* 2012; 49:665-672
18. Hollestein LM, van den Akker SA, Nijsten T, Karim-Kos HE, Coebergh JW, de Vries E. Trends of cutaneous melanoma in the Netherlands: increasing incidence rates among Breslow thickness categories and rising mortality rates since 1989. *Ann Oncol* 2012; 23:524-530
19. Murray Cs, Stockton DL, Doherty VR. Thick melanoma: the challenge persists. *Br J Dermatol* 2005; 152: 104-109
20. Geller AC, Elwood M, Swetter SM, Brooks DR, Aitken J, Youl PH, Demierre MF, Baade PD. Factors related to the presentation of thin and thick nodular melanoma from a population-based cancer registry in Queensland Australia. *Cancer* 2009; 115: 1318-1327
21. Gimotty PA, Guerry D, Ming ME, Elenitsas R, Xu X, Czerniecki B, Spitz F, Schuchter L, Elder D. Thin primary cutaneous malignant melanoma: A prognostic tree for 10-year metastasis is more accurate than American joint committee on cancer staging. *J Clin Oncol* 2004; 22:3668-3676



22. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970; 172: 902-908
23. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3668-3676
24. Thompson JK, Soong SJ, Balch CM, Gershenwald JE, Ding S, Coit DG, Flaherty KT, Gimotty PA, Johnson T, Johnson MM, Leong SP, Ross MI, Byrd DR, Cascinelli N, Cochran AJ, Eggermont AM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Sondak VK. Prognosis significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American joint committee on cancer melanoma staging database. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2199-2205
25. In't Hout FE, Haydu LE, Murali R, Bonenkamp JJ, Thompson JF, Scolyer RA. Prognostic importance of the extent of ulceration in patients with clinically localized cutaneous melanoma. *Ann Surg* 2012; 255: 1165-1170
26. Day CL Jr, Sober AJ, Kopf AW, Lew RA, Mihm MC Jr, Golomb FM, Postel A, Hennessey P, Harris MN, Gumport SL, Raker JW, Malt RA, Cosimi AB, Wood WC, Roses DF, Gorstein F, Fitzpatrick TB. A prognostic model for clinical stage I melanoma of the trunk: Location near the midline is not an independent risk factor for recurrent disease. *Am J Surg* 1981, 142: 247-251
27. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th. Model predicting survival in stage I melanoma based on progression. *J Natl Cancer Inst* 1989, 81:1893-1904.
28. Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2013, 30: 2678-2683.
29. Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969, 29:705-727.
30. Olah J, Gyulai R, Korom I, Varga E, Dobozy A. Tumor regression predicts higher risk of sentinel node involvement in thin cutaneous melanoma. *Br J Dermatol* 2003; 149:662-663.

31. Ribero S, Osella-Abate S, Sanlorenzo M, Savoia P, Astrua C, Cavaliere G, Favourable prognostic role of regression of primary melanoma in stage I-II AJCC patients. *Br J Dermatol* 2013; 169: 1240-1244.
32. Storr SJ, Safuan S, Mitra A, Elliott F, Walker C, Vasko MJ, Ho B, Cook M, Mohammed RA, Patel PM, Ellis IO, Newton- bishop JA, Martin SG. Objective assessment of blood and lymphatic vessel invasion and association wuth macrophage infiltration in cutaneous melanoma. *Mod Pathol* 2012; 25:493-504
33. Xu X, Chen L, Guerry D, Dawsn PR, Hwang WT, VanBelle P, Elder DE, Zhang PJ, Ming ME, Schuchter L, Gimotty PA. Lymphatic invasion is independently prognostic of metastasis in primary cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 2012; 18:229-237.
34. Van der Ploeg AP, van Akkooi AC, Schmitz PI, Koljenovic S, Verhoef C, Eggermont AM. EORTC melanoma group sentinel node protocol identifies hight rate of submicrometastases according to Rotterdam criteria. *Eur J Cancer* 2012; 46:2414-2421.
35. Mandalà M, Massi D. Tissue prognostic biomarkers in primary cutaneous melanoma. *Virchows Arch* 2014; 464:265-281
36. Altman DG, McShane LM, Sauerbrei W, Taube SE. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK): explanation and elaboration. *PLoS Med.* 2012;9:e1001216. doi: 10.1371/journal.pmed.1001216.
37. Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, SeftorE, Hendrix M, Radmacher M, Simon R, Yakhini Z, Ben-Dor A, Sompas N, Dougherty E, Wang E, Marincola F, Gooden C, Lueders J, Glatfelter A, Pollock P, Carpten J, Gillanders E, Leja D, Dietrich K, BeaudryC, Berens M, Alberts D, Sondak V. Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 2000; 406: 536-540
38. Tremante E, Ginebri A, Lo Monaco E, Frascione P, Di Filippo F, Terrenato I, Benevolo M, Mottolese M, Pescarmona E, Visca P, Natali PG, Giacomini P. Melanoma molecular classes and prognosis in the postgenomic era. *Lancet Oncol* 2012; 13:e205-e211.
39. Gerami P, Cook RW, Wilkinson J, Russell MC, Dhillon N, Amaria RN, Gonzalez R, Lyle S, Johnson CE, Oelschlager KM, Jackson GL, Greisinger AJ, Maetzold D, Delman KA, Lawson DH, Stone JF. Development of a prognostic genetic signature to predict the

metastatic risk associated with cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res.* 2015;21:175-183. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3316

40. Gerami P, Cook RW, Russell MC, Wilkinson J, Amaria RN, Gonzalez R, Lyle S, Jackson GL, Greisinger AJ, Johnson CE, Oelschlager KM, Stone JF, Maetzold DJ, Ferris LK, Wayne JD, Cooper C, Obregon R, Delman KA, Lawson D. Gene expression profiling for molecular staging of cutaneous melanoma in patients undergoing sentinel lymph node biopsy. *J Am Acad Dermatol.* 2015;72:780-5.e3. doi: 10.1016/j.jaad.2015.01.009

41. Flaherty KT, Hodi FS, Bastian BC. Mutation-driven drug development in melanoma. *Curr Opin Oncol* 2010; 22:178-183.

42. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002; 417:949-954.

43. Ellerhorst JA, Greene VR, Ekmekcioglu S, Warneke CL, Johnson MM, Cooke CP, Wang LE, Prieto VG, Gershenwald JE, Wei Q, Grimm EA. Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clin Cancer Res.* 2011;17:229-235. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2276.

44. Edlundh-Rose E, Egyházi S, Omholt K, Månsson-Brahme E, Platz A, Hansson J, Lundeberg J. NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res.* 2006;16:471-478.

45. Devitt B, Liu W, Salemi R, Wolfe R, Kelly J, Tzen CY, Dobrovic A, McArthur G. Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24:666-672. doi: 10.1111/j.1755-148X.2011.00873.x.

46. Jakob JA, Bassett RL Jr, Ng CS, Curry JL, Joseph RW, Alvarado GC, Rohlfs ML, Richard J, Gershenwald JE, Kim KB, Lazar AJ, Hwu P, Davies MA. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer*. 2012; 118:4014-4023. doi: 10.1002/cncr.26724
47. Nagore E, Hacker E, Martorell-Calatayud A, Traves V, Guillen C, Hayward NK, Whiteman D. Prevalence of BRAF and NRAS mutations in fast-growing melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013; 26:429-431. doi: 10.1111/pcmr.12082.
48. Hendrix MJ, Seftor EA, Kirschmann DA, Quaranta V, Seftor RE. Remodeling of the microenvironment by aggressive melanoma tumor cells. *Ann N Acad Sci* 2003; 995:151-61.
49. Johnson JP. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 1999; 18:345-357
50. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;6:1420-1428, doi: 10.1172/JCI39104
51. Thiery JP, Acloque H, Huang YJR, Nieto MA. Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* 2009; 139: 871-890.
52. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7:131-142
53. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer* 2007; 7:415–428
54. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumour metastasis. *Dev Cell* 2008; 14:818-829
55. Eger A, Stockinger A, Schaffhauser B, Beug H, Foisner R. Epithelial mesenchymal transition by c-Fos estrogen receptor activation involves nuclear translocation of beta-catenin and upregulation of beta-catenin /lymphoid enhancer binding factor-1 transcriptional activity. *J Cell Biol* 2000; 148:173-188
56. De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Reviews Cancer* 2013; 13: 97–110

57. Chakrabarti R, Hwang J, Andres Blanco M, Wei Y, Lukačičin M, Romano RA, Smalley K, Liu S, Yang Q, Ibrahim T, Mercatali L, Amadori D, Haffty BG, Sinha S, Kang Y. E1f5 inhibits the epithelial-mesenchymal transition in mammary gland development and breast cancer metastasis by transcriptionally repressing Snail2. *Nat Cell Biol* 2012; 14: 1212-1222-
58. Savagner P, Yamada KM, Thiery JP (1997). The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial–mesenchymal transition. *J Cell Biol* 1997; 137: 1403–1419,
59. Boyer B, Tucker GC, Vallés AM, Franke WW, Thiery JP. Rearrangements of desmosomal and cytoskeletal proteins during the transition from epithelial to fibroblastoid organization in cultured rat bladder carcinoma cells. *J Cell Biol* 1989; 109: 1495–1509.
60. Herfs M, Hubert P, Suarez-Carmona M, Reschner A, Saussez S, Berx G, Savagner P, Boniver J, Delvenne P. Regulation of p63 isoforms by snail and slug transcription factors in human squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 2010; 176: 1941–1949.
61. Lindsay J, McDade SS, Pickard A, McCloskey KD, McCance DJ. Role of  $\Delta$ Np63 $\gamma$  in Epithelial to Mesenchymal Transition. *J Biol Chem*. 2011; 286: 3915-3924, doi: 10.1074/jbc.M110.162511
62. Boldrup L, Coates PJ, Gu X, Nylander K. DeltaNp63 isoforms regulate CD44 and keratins 4, 6, 14 and 19 in squamous cell carcinoma of head and neck. *J Pathol* 2007; 213: 384–391.
63. Vlahopoulos SA, Logotheti S, Mikas D, Giarika A, Gorgoulis V, Zoumpourlis V . The role of ATF-2 in oncogenesis. *BioEssays* 2008; 30: 314–327
64. Huber MA, Beug H, Wirth T. Epithelial-mesenchymal transition: NF-kappaB takes center stage. *Cell Cycle* 2004; 3: 1477–1480;
65. Katoh Y, Katoh M (Sep 2008). Hedgehog signaling, epithelial-to-mesenchymal transition and miRNA. *Int J Mol Med*. 22: 271–275.
66. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels between Normal Development and Tumor Progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; 15: 117–134.

67. Kang Y, He W, Tulley S, Gupta GP, Serganova I, Chen CR, Manova-Todorova K, Blasberg R, Gerald WL, Massagué J. Breast cancer bone metastasis mediated by the Smad tumor suppressor pathway. *PNAS* 2005; 102: 13909–14.
68. Chang C, Chao C, Xia W, Yang J, Xiong Y, Li C, Yu W, Rehman SK, Hsu JL, Lee H, Liu M, Chen C, Yu D, Hung M. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT) and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 317-323.
69. Bhowmick NA, Zent R, Ghiassi M, McDonnell M, Moses HL. Integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity. *J Biol Chem.* 2001;276:46707-46713.
70. Prunier C, Howe PH. Disabled-2 (Dab2) is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT). *J Biol Chem.* 2005; 280:17540-17548.
71. Vallés AM, Boyer B, Tarone G, Thiery JP. Alpha 2 beta 1 integrin is required for the collagen and FGF-1 induced cell dispersion in a rat bladder carcinoma cell line. *Cell Adhes, Commun* 1996; 4:187-199
72. Balzac F1, Avolio M, Degani S, Kaverina I, Torti M, Silengo L, Small JV, Retta SF. E-cadherin endocytosis regulates the activity of Rap1: a traffic light GTPase at the crossroads between cadherin and integrin function. *J Cell Sci.* 2005;118:4765-4783.
73. Alonso SR, Tracey L, Ortiz P, Pérez-Gómez B, Palacios J, Pollán M, Linares J, Serrano S, Sáez-Castillo AI, Sánchez L, Pajares R, Sánchez-Aguilera A, Artiga MJ, Piris MA, Rodríguez-Peralto JL. A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Res.* 2007; 67:3450-3460.
74. Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol.* 2000; 148:779-790.
75. Hao L, Ha JR, Kuzel P, Garcia E, Persad S. Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail. *Br J Dermatol.* 2012; 166:1184-1197. doi: 10.1111/j.1365-2133.2012.10824.x
76. Jendraschak E, Sage EH. Regulation of angiogenesis by SPARC and angiostatin:

- implications for tumor cell biology. *Semin Cancer Biol.* 1996; 7:139-146.
77. Samanna V, Wei H, Ego-Osuala D, Chellaiah MA. Alpha-V-dependent outside-in signaling is required for the regulation of CD44 surface expression, MMP-2 secretion, and cell migration by osteopontin in human melanoma cells. *Exp Cell Res.* 2006; 312:2214-2230.
78. Zhou Y, Dai DL, Martinka M, Su M, Zhang Y, Campos EI, Dorocicz I, Tang L, Huntsman D, Nelson C, Ho V, Li G. Osteopontin expression correlates with melanoma invasion. *J Invest Dermatol.* 2005; 124:1044-1052.
79. Smit DJ, Gardiner BB, Sturm RA. Osteonectin downregulates E-cadherin, induces osteopontin and focal adhesion kinase activity stimulating an invasive melanoma phenotype. *Int J Cancer.* 2007; 121:2653-2660.
80. Kageshita T, Hamby CV, Hirai S, Kimura T, Ono T, Ferrone S. Alpha(v)beta3 expression on blood vessels and melanoma cells in primary lesions: differential association with tumor progression and clinical prognosis. *Cancer Immunol Immunother.* 2000; 49:314-318.
81. Ledda F, Bravo AI, Adris S, Bover L, Mordoh J, Podhajcer OL. The expression of the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma. *J Invest Dermatol.* 1997; 108:210-214.
82. Barth PJ, Moll R, Ramaswamy A. Stromal remodeling and SPARC (secreted protein acid rich in cysteine) expression in invasive ductal carcinomas of the breast. *Virchows Arch.* 2005; 446:532-6.
83. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Brekken RA, Sivridis E, Gatter KC, Harris AL, Sage EH. Enhanced expression of SPARC/osteonectin in the tumor-associated stroma of non-small cell lung cancer is correlated with markers of hypoxia/acidity and with poor prognosis of patients. *Cancer Res.* 2003; 63:5376-5380.
84. Yamashita K, Upadhyay S, Mimori K, Inoue H, Mori M. Clinical significance of secreted protein acidic and rich in cysteine in esophageal carcinoma and its relation to carcinoma progression. *Cancer.* 2003;97:2412-2419.
85. Guweidhi A, Kleeff J, Adwan H, Giese NA, Wente MN, Giese T, Büchler MW, Berger MR, Friess H. Osteonectin influences growth and invasion of pancreatic cancer cells. *Ann Surg.* 2005; 242:224-234.
86. Yamanaka M, Kanda K, Li NC, Fukumori T, Oka N, Kanayama HO, Kagawa S. Analysis

of the gene expression of SPARC and its prognostic value for bladder cancer. *J Urol*. 2001; 166:2495-2499.

87. Porter PL, Sage EH, Lane TF, Funk SE, Gown AM. Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *J Histochem Cytochem*. 1995 Aug;43(8):791-800

88. Infante JR, Matsubayashi H, Sato N, Tonascia J, Klein AP, Riall TA, Yeo C, Iacobuzio-Donahue C, Goggins M. Peritumoral fibroblast SPARC expression and patient outcome with resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2007;25:319-325

89. Huang H, Colella S, Kurrer M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. *Cancer Res*. 2000; 60:6868-6874.

90. Horie K, Tsuchihara M, Nakatsura T. Silencing of secreted protein acidic and rich in cysteine inhibits the growth of human melanoma cells with G arrest induction. *Cancer Sci*. 2010;101:913-919. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01476.x.

91. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011; 331: 1559–1564.

92. Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem*. 2005; 280:8094-8100.

93. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-15. doi: 10.1016/j.cell.2008.03.027.

94. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(6):442-54

95. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer". *Oncogene* 2010; 29: 4741–4751.

96. Massagué J. TGFbeta in Cancer. *Cell*. 2008;134:215-230. doi:10.1016/j.cell.2008.07.001.

97. Chu, IM; Lai, WC; Aprelikova, O; El Touny, LH; Kouros-Mehr, Hosein; Green, JE. Expression of GATA3 in MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells induces a



growth inhibitory response to TGF $\beta$ . PLoS ONE. 2013; 8:e61125. doi: 10.1371/journal.pone.0061125

98. Kajiya H, Shibata K, Terauchi M, Yamashita M, Ino K, Nawa A, Kikkawa F. Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. *Int J Oncol* 2007; 31: 277–283

99. Biddle A, Mackenzie IC. Cancer stem cells and EMT in carcinoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2012; 31:285-293

100. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term 'stem cell'. *Cell Stem Cell.* 2007; 1:35–38

101. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature.* 1963; 197:452-454.

102. Ambler CA, Määttä A. Epidermal stem cells: location, potential and contribution to cancer. *J Pathol.* 2009; 217:206-216. doi: 10.1002/path.2468.

103. Li L, Fukunaga-Kalabis M, Yu H, Xu X, Kong J, Lee JT, Herlyn M. Human dermal stem cells differentiate into functional epidermal melanocytes. *J Cell Sci.* 2010; 123:853-860. doi: 10.1242/jcs.061598.

104. Nishimura EK, Granter SR, Fisher DE. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science.* 2005; 307:720-724.

105. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981; 292:154-156.

106. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282:1145-1147.

107. Girouard SD, Murphy GF. Melanoma stem cells: not rare, but well done. *Lab Invest.* 2011; 91:647-64. doi: 10.1038/labinvest.2011.50.

108. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001; 414:105-111.

109. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. Cancer stem cells: perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 2006; 66:9339-9344.
110. Bruce WR, Van Der Gaag H. A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature.* 1963; 199:79-80.
111. Park CH, Bergsagel DE, McCulloch EA. Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. *J Natl Cancer Inst.* 1971; 46:411-422.
112. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997; 3:730-737.
113. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994; 367:645-648.
114. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:3983-3988.
115. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004; 432:396-401
116. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007; 445:106-110.
117. Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Zhan Q, Jordan S, Duncan LM, Weishaupt C, Fuhlbrigge RC, Kupper TS, Sayegh MH, Frank MH. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature.* 2008; 451:345-349. doi: 10.1038/nature06489.
118. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 2005; 65:9328-9337.
119. Klein WM, Wu BP, Zhao S, Wu H, Klein-Szanto AJ, Tahan SR. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod Pathol.* 2007; 20:102-107.
120. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.*

2004; 432:396-401.

121. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007; 445:106-110.

122. Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E, Corsini E, Benetti A, Cavazzin C, Gritti A, Piccinini A, Porro D, Santinami M, Invernici G, Parati E, Alessandri G, La Porta CA. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential. *Eur J Cancer*. 2007;43:935-946.

123. Lai CY, Schwartz BE, Hsu MY. CD133+ melanoma subpopulations contribute to perivascular niche morphogenesis and tumorigenicity through vasculogenic mimicry. *Cancer Res*. 2012; 72:5111-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0624.

124. Frank NY, Pendse SS, Lapchak PH, Margaryan A, Shlain D, Doeing C, Sayegh MH, Frank MH. Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem*. 2003; 278:47156-47165.

125. Frank NY, Margaryan A, Huang Y, Schatton T, Waaga-Gasser AM, Gasser M, Sayegh MH, Sadee W, Frank MH. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res*. 2005;65:4320-4333

126. Sharma BK, Manglik V, Elias EG. Immuno-expression of human melanoma stem cell markers in tissues at different stages of the disease. *J Surg Res*. 2010; 163:e11-5. doi: 10.1016/j.jss.2010.03.043.

127. Vásquez-Moctezuma I, Meraz-Ríos M.A, Villanueva-López C.G, Magaña M., Martínez-Macias R, Sánchez-González D.J, García-Sierra F, Herrera-González N.E.

ATP-binding Cassette Transporter ABCB5 Gene is Expressed with Variability in Malignant Melanoma. *Actas Dermosifiliogr* 2010; 101:341-348

128. Botelho MG, Wang X, Arndt-Jovin DJ, Becker D, Jovin TM. Induction of terminal differentiation in melanoma cells on downregulation of beta-amyloid precursor protein. *J Invest Dermatol*. 2010; 130:1400-1410. doi: 10.1038/jid.2009.296.

129. Cohen PR, Rapini RP, Farhood AI. Expression of the human hematopoietic progenitor cell antigen CD34 in vascular and spindle cell tumors. *J Cutan Pathol*. 1993; 20:15-20.

130. Molgaard HV, Spurr NK, Greaves MF. The hemopoietic stem cell antigen, CD34, is encoded by a gene located on chromosome 1. *Leukemia*. 1989; 3:773-776.

131. Weiss SW, Nickoloff BJ. CD-34 is expressed by a distinctive cell population in peripheral nerve, nerve sheath tumors, and related lesions. *Am J Surg Pathol*. 1993; 17:1039-1045.
132. Breza TS, Magro CM. CD34 expression in primary cutaneous malignant melanoma: apropos of a case and review of the aberrant melanoma phenotype. *J Cutan Pathol*. 2005; 32:685-689.
133. Hoang MP, Selim MA, Bentley RC, Burchette JL, Shea CR. CD34 expression in desmoplastic melanoma. *J Cutan Pathol*. 2001; 28:508-512.
134. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. Quinatan E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. *Nature*. 2008; 456:593-598. doi: 10.1038/nature07567.
135. Quintana E, Shackleton M, Foster HR, Fullen DR, Sabel MS, Johnson TM, Morrison SJ. Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell*. 2010; 18:510-523.
136. Carey, T. E., Takahashi, T., Resnick, L. A., Oettgen, H. F. & Old, L. J. Cell surface antigens of human malignant melanoma: Mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells\* *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976, 73:3278-3282.
137. Herlyn, M., Balaban, G., Bannicelli, J., Guerry, D. P., IV, Halaban, R., Herlyn, D., Elder, D. E., Maul, G. G., Steplewski, Z., Nowell, P. C., Clark, W. H. & Koprowski, H. Primary melanoma cells of the vertical growth phase: similarities to metastatic cells. *J Natl Cancer Inst*. 1985; 74:283-289.
138. Gil-Benso R, Monteagudo C, Cerdá-Nicolás M, Callaghan RC, Pinto S, Martínez-Romero A, Pellín-Carcelén A, San-Miguel T, Cigudosa JC, López-Ginés C. Characterization of a new human melanoma cell line with CD133 expression. *Hum Cell*. 2012; 25:61-67.
139. Pisacane AM1, Picciotto F, Risio M. CD31 and CD34 expression as immunohistochemical markers of endothelial transdifferentiation in human cutaneous melanoma. *Cell Oncol*. 2007; 29:59-66.
140. Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*. 2013; 13:963-972.

141. Al Dhaybi R, Sartelet H, Powell J, Kokta V. Expression of CD133+ cancer stem cells in childhood malignant melanoma and its correlation with metastasis. *Mod Pathol*. 2010; 23:376-380. doi: 10.1038/modpathol.2009.163.
142. Wessel C, Westhoff CC, Nowak K, Moll I, Barth PJ. CD34(+) fibrocytes in melanocytic nevi and malignant melanomas of the skin. *Virchows Arch*. 2008; 453:485-489. doi: 10.1007/s00428-008-0667-9.
143. Kato Y, Franken F, Noël A, Sakai N, Nagashima Y, Koshika S, Miyazaki K, Foidart JM. High production of SPARC/osteonectin/BM-40 in mouse metastatic B16 melanoma cell lines. *Pathol Oncol Res*. 2000; 6:24-26.
144. Denhardt D. Osteopontin expression correlates with melanoma invasion. *J Invest Dermatol*. 2005; 124:xvi-xviii.
145. Rumpler G, Becker B, Hafner C, McClelland M, Stolz W, Landthaler M, Schmitt R, Bosserhoff A, Vogt T. Identification of differentially expressed genes in models of melanoma progression by cDNA array analysis: SPARC, MIF and a novel cathepsin protease characterize aggressive phenotypes. *Exp Dermatol*. 2003; 12:761-771.
146. Felicetti F, Bottero L, Felli N, Mattia G, Labbaye C, Alvino E, Peschle C, Colombo MP, Carè A. Role of PLZF in melanoma progression. *Oncogene*. 2004; 23:4567-4576
147. Robert G, Gaggioli C, Bailet O, Chavey C, Abbe P, Aberdam E, Sabatié E, Cano A, Garcia de Herreros A, Ballotti R, Tartare-Deckert S. SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development. *Cancer Res*. 2006; 66:7516-7523.
148. González-Herrero I, Romero-Camarero I, Cañueto J, Cardeñoso-Álvarez E, Fernández-López E, Pérez-Losada J, Sánchez-García I, Román-Curto C. CD133+ cell content correlates with tumour growth in melanomas from skin with chronic sun-induced damage. *Br J Dermatol*. 2013; 169:830-837. doi: 10.1111/bjd.12428.
149. Sharma BK, Manglik V, O'Connell M, Weeraratna A, McCarron EC, Broussard JN, Divito KA, Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Zapas JL. Clonal dominance of CD133+ subset population as risk factor in tumor progression and disease recurrence of human cutaneous melanoma. *Int J Oncol*. 2012; 41:1570-1576. doi: 10.3892/ijo.2012.1590.

150. Civenni G, Walter A, Kobert N, Mihic-Probst D, Zipser M, Belloni B, Seifert B, Moch H, Dummer R, van den Broek M, Sommer L. Human CD271-positive melanoma stem cells associated with metastasis establish tumor heterogeneity and long-term growth. *Cancer Res.* 2011; 71:3098-3109. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3997
151. Klein WM, Wu BP, Zhao S, Wu H, Klein-Szanto AJ, Tahan SR. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod Pathol.* 2007; 20:102-107.
152. Girouard SD, Murphy GF. Melanoma stem cells: not rare, but well done. *Lab Invest.* 2011; 91:647-664. doi: 10.1038/labinvest.2011.50.
153. Qu X, Shen L, Zheng Y, Cui Y, Feng Z, Liu F, Liu J. A signal transduction pathway from TGF- $\beta$ 1 to SKP2 via Akt1 and c-Myc and its correlation with progression in human melanoma. *J Invest Dermatol.* 2014; 134:159-167. doi: 10.1038/jid.2013.281.

## 6. Anexos